

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la enfermedad renal y la respuesta al tratamiento
(antimoniales "versus" miltefosina) en perros con infección natural
por "Leishmania infantum"**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Ángeles Daza González

Directoras

**Cristina Fragío Arnold
Guadalupe Miró Corrales**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGIA ANIMAL



**ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD RENAL Y LA
RESPUESTA AL TRATAMIENTO
(ANTIMONIALES *VERSUS* MILTEFOSINA) EN
PERROS CON INFECCIÓN NATURAL
POR *LEISHMANIA INFANTUM***

**Memoria presentada por M^a Ángeles Daza González para optar al grado de
Doctora en Veterinaria**

Madrid, Noviembre 2015

Directoras: Cristina Fragío Arnold

Guadalupe Miró Corrales

A mis padres Angel y M^a Carmen

AGRADECIMIENTOS

Escribir el apartado de agradecimientos es sin dudas la parte más emotiva de todo trabajo y le hace a uno darse cuenta de lo importante que es estar rodeado de una estructura social equilibrada. Sin ese equilibrio no sería posible mantener la mente suficientemente clara como para llevar a cabo este tipo de proyectos.

No creo que en una hoja sea posible expresar mi más profundo agradecimiento tanto desde el punto de vista científico, a todas las personas que directa o indirectamente me han ayudado a elaborar este manuscrito, como desde el punto de vista personal a las que permanecen en mi círculo social más cercano y que creen en mí.

En primer lugar la persona más importante en mi desarrollo en la especialidad de "Emergencias y cuidados intensivos", Cristina Fragío Arnold. A ella le debo tantas cosas que no sé ni por donde empezar. Gracias por poner en mis manos los medios, por la dirección, por haberme introducido en el mundo de las urgencias, por dejarme conocer gente, por el apoyo y la preocupación. Sin más GRACIAS! GRACIAS! Y MAS GRACIAS!!!!

A Guadalupe Miro Corrales, mi otra directora, gracias por la dirección, la corrección, el interés y el apoyo. Había ganas por completar el conocimiento de esta enfermedad en el ámbito de la nefrología y creo que hemos conseguido comenzar un largo camino. GRACIAS!

A Maria Luisa Fermin Rodríguez por su meticuloso trabajo, su ayuda en las electroforesis que fue más que fundamental, por compartir conmigo lo que sabe, resolverme tantas dudas, por la charla y el cariño. A las chicas del laboratorio (Ana, Eva, Pilar y Carmen) por los ánimos.

A J.J. Cerón por su amabilidad y por el estudio de las proteínas de fase aguda que resultaron decisivas en este trabajo.

A Ricardo García Mata por ayudarme, con gran paciencia, a entender un poco la estadística.

A los compañeros de Saluvet por dejarme desinteresadamente unos equipos tan complicados.

A mis compañeros del área de pequeños animales del HCVC y en especial a Miriam Portero y Miguel Rodríguez Castaño por aguantar todos los días. Al servicio de diagnóstico por la imagen porque son un apoyo importantísimo. A Camen y José Manuel por gestionarlo todo tan bien.

A Cristina Rupérez y Cristeta Fraile por contar con el servicio de Hospitalización de pequeños animales en el tratamiento de los complejíssimos pacientes de la consulta de PIP. A Ana y a Rocío por estar pendientes, acudir a por las muestras y procesarlas.

A todos los internos/residentes del hospital clínico veterinario complutense que han pasado con nuestras intalaciones y que aportan muchas ganas.

A Elena Pinilla y a la fundación ALCER Madrid porque gracias a su altruismo hemos podido llevar a cabo un sueño, dializar a nuestros enfermos renales.

A mi familia y mis amigos de toda la vida, imposible ponerlos a todos, ellos saben que son lo más importante. A los que ya no están y de los que me acuerdo todos los días.

En general gracias a todas las personas que con sus pequeñas aportaciones nos hacen la vida un poco más fácil.

LISTA DE ABREVIATURAS

Alb: Albúmina.

A/G: Cociente albúmina /globulinas.

CaT: Calcio total.

Cr: Creatinina.

DU: Densidad urinaria.

D.O.: Densidad óptica.

EF: Excreción fraccionada.

ERC: Enfermedad renal crónica.

FS: Ferritina sérica.

GB: Glóbulos blancos.

GlobT: Globulinas totales.

Htc: Hematocrito.

Hp: Haptoglobina.

IC: Inmunocomplejo.

iCa: Calcio ionizado.

ICS: Infectado clínicamente sano.

IECA: Inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

IRIS: Sociedad internacional de interés renal.

kDa: Kilodaltons.

Lcan: Leishmaniosis canina.

NGAL: Lipocalina-gelatinasa neutrofílica urinaria.

NP: No proteinuria.

P: Proteinuria.

PB: Proteinuria *border line*.

PAPM: Proteínas de alto peso molecular.

PAS: Presión arterial sistólica.

PBPM: Proteínas de bajo peso molecular.

PC: Puntuación clínica.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PFA: Proteínas de fase aguda.

Pinorg: Fósforo inorgánico.

PON-1: Paraoxonasa-1.

Prot. CR: Proteína C reactiva.

PT: Proteínas totales.

PTH: Paratohormona.

PTR: Proteína transportadora de retinol.

q-PCR: PCR cuantitativa.

RAA: Eje renina angiotensina aldosterona.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SDMA: Dimetilarginina simétrica.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

TFG: Tasa de filtración glomerular.

UPC: Ratio proteína /creatinina en orina.

ÍNDICE

	<u>pág.</u>
1.- RESUMEN	4
2.- SUMMARY	10
3.- INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	14
4.- OBJETIVOS	20
5.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
5.1.- Leishmaniosis canina	24
5.1.1.- Etiología y biología	24
5.1.2.- Patogenia	24
5.1.2.1.- Lesión renal inducida por <i>Leishmania infantum</i>	26
5.1.3.- Diagnóstico	28
5.1.4.- Tratamiento	33
5.1.5.- Profilaxis	41
5.2.- Fisiopatología renal	42
5.3.- Marcadores de función renal	48
5.3.1.- Marcadores de función glomerular	48
5.3.1.1.- Marcadores clásicos de función glomerular	48
5.3.1.2.- Marcadores nuevos de función glomerular.....	56
5.3.2.- Marcadores de función tubular.....	57
5.3.2.1.- Marcadores clásicos de función tubular	57
5.3.2.2.- Marcadores nuevos de función tubular	58
5.3.3.- Electroforesis de proteínas en orina	59
5.4.- Enfermedad renal crónica	61
5.5.- Proteínas de fase aguda (PFA)	75

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.- Población de estudio	84
6.1.2.- Criterios de inclusión.....	84
6.1.3.- Evaluación y clasificación de los pacientes.....	84
6.1.4.- Grupos de tratamiento.....	86
6.2.- Metodología y determinación de marcadores	86
6.3.- Análisis estadístico	94

7.- RESULTADOS

7.1.- INTRODUCCIÓN	98
7.2.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO	98
7.2.1.- De la población total a día cero (D0)	98
7.2.1.1.- Parámetros clínicos	98
7.2.1.2.- Diagnóstico parasitológico e inmunológico.....	102
7.2.1.3.- Parámetros hematológicos y bioquímicos	105
7.2.1.4.- Parámetros de función renal	107
7.2.1.5.- Proteínas de fase aguda	110
7.2.2.- Grupo Glucantime® controles clínicos y laborales (D0, D30, D90)	113
7.2.3.- Grupo Milteforán® controles clínicos y laborales (D0, D30, D90)	130
7.3.- ANALISIS COMPARATIVO	
7.3.1.- Comparación de la evolución clínica y laboral entre los grupos Glucantime® y Milteforan®	146
7.3.2.- Evolución clínica y laboral del grupo Glucantime®	154
7.3.3.- Evolución clínica y laboral del grupo Milteforan®	165
7.4.- ANÁLISIS DE CORRELACIÓN	172
8.- DISCUSIÓN	176
9.- CONCLUSIONES	210
10.- BIBLIOGRAFIA	216

11.- ANEXOS	246
--------------------------	------------

1.- RESUMEN

1.- RESUMEN

La leishmaniosis canina (Lcan) es una zoonosis en toda la Cuenca Mediterránea y está producida por un protozoo intracelular, *Leishmania infantum*, transmitido por especies del género *Phlebotomus*. La enfermedad se caracteriza por una presentación clínica heterogénea en la cual la lesión renal es, con frecuencia, la causa principal de mortalidad. La nefropatía asociada a Lcan se atribuye fundamentalmente al depósito intraglomerular de inmunocomplejos circulantes.

La combinación de antimonio de n-meglumina (antimoniales) con alopurinol se considera el tratamiento de primera línea en esta enfermedad, aunque algunos estudios han demostrado que la combinación de miltefosina y alopurinol tiene una eficacia similar. A pesar de ser considerado el tratamiento más eficaz, el uso de antimonio se asocia a efectos adversos sobre la funcionalidad renal lo cual puede ocasionar complicaciones importantes en el manejo de estos pacientes. A ello se suma la escasa sensibilidad de las pruebas diagnósticas disponibles hasta ahora en la clínica veterinaria para poder establecer un diagnóstico precoz de lesión renal. Es decir, el propio tratamiento podría agravar una posible alteración en la funcionalidad renal en pacientes que ya la tuvieran alterada debido a la leishmaniosis.

Los perros infectados y tratados, en la mayoría de los casos, no alcanzan la curación parasitológica y sufren recidivas después del tratamiento. Las técnicas habituales para valorar la respuesta al tratamiento son la evolución de la tasa de anticuerpos y la electroforesis de proteínas plasmáticas. La normalización de las proteínas plasmáticas ocurre en paralelo con la mejoría clínica, pudiéndose emplear como marcadores de respuesta al tratamiento; sin embargo, la serología parece menos útil, a corto plazo, porque el descenso del título de anticuerpos es más lento. Se ha postulado que otros parámetros laboratoriales, como las proteínas de fase aguda, pueden ser una buena opción como marcadores precoces de la enfermedad y también para la monitorización del tratamiento.

En este estudio se plantearon dos objetivos principales:

- el primero fue evaluar y comparar el efecto de las dos combinaciones más utilizadas en el tratamiento de Lcan (antimoniales/alopurinol y miltefosina/alopurinol) sobre la respuesta humoral, carga parasitaria y respuesta inflamatoria sistémica asociada a esta enfermedad y su relación con los parámetros clínicopatológicos. Para ello se determinaron en tres tiempos diferentes (día del diagnóstico, 30 y 90 días tras el inicio del tratamiento), los parámetros laboratoriales y bioquímicos empleados habitualmente en la clínica diaria (inmunofluorescencia indirecta, electroforesis de

proteínas plasmáticas, hemograma completo, ALT, urea, creatinina, proteínas totales plasmáticas, calcio y fósforo séricos), parámetros indicativos de la carga parasitaria (PCR anidada y PCR cuantitativa o qPCR y citología de aspirados de médula ósea, así como ambas PCRs en orina) y las proteínas de fase aguda más representativas: proteína C reactiva, haptoglobina, ferritina y paraoxonasa-1 y albúmina.

- el segundo fue valorar el impacto que estos dos tratamientos tuvieron sobre la funcionalidad renal. Para ello se determinaron el aclaramiento de creatinina exógena como técnica específica de valoración de la funcionalidad renal antes del tratamiento y al final del estudio, y la determinación del ratio proteína/creatinina en orina, concentración plasmática de creatinina y urianálisis completo. Con el fin de caracterizar mejor la posible lesión renal asociada a la enfermedad y a sus tratamientos, se realizaron también electroforesis en gel de poliacrilamida sobre muestras de orina en todos los pacientes antes y después del tratamiento.

En total se incluyeron en el estudio 20 perros diagnosticados de Lcan en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid. El diagnóstico se realizó inicialmente mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), y se confirmó posteriormente mediante PCR anidada y qPCR de aspirados de médula ósea y/o linfonódulo. Los perros fueron clasificados en dos grupos de tratamiento, antimoniales con alopurinol (Grupo G) y miltefosina con alopurinol (Grupo M)). Los pacientes de ambos grupos que por sus alteraciones laboratoriales o clínicopatológicas necesitaron tratamiento nefroprotector fueron tratados con dieta renal, IECA (benazeprilo) en el caso de los proteinúricos, un bloqueante de los canales del calcio (amlodipino) en los hipertensos que no respondieron al benazeprilo y en los que se detectó hipoalbuminemia se administró ácido acetil salicílico.

Los resultados obtenidos con respecto a la puntuación clínica no demostraron diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento, a lo largo de todo el periodo de estudio, ya que en todos los perros se produjo una mejoría similar de los signos clínicos y ganancia de peso en relación al inicio del estudio previo al tratamiento. La normalización de la presión arterial fue más significativa en el Grupo G.

Tampoco hubo diferencias entre ambos grupos en cuanto a la evolución de la titulación de anticuerpos determinada por IFI. La qPCR permitió valorar la reducción de la carga parasitaria en pacientes que seguían siendo positivos mediante PCR anidada. Por último, los resultados de la PCR en orina fueron negativos en todas las muestras antes y después del tratamiento, evidenciando la ausencia de antígeno parasitario en pacientes que seguían eliminando proteínas de bajo peso molecular en la orina.

En relación a la electroforesis de proteínas plasmáticas se evidenció una mayor normalización de las mismas en el Grupo G, sobre todo en relación a los niveles de albúmina, cociente albúmina/globulinas y globulinas totales.

El antimonio de meglumina fue más efectivo que la miltefosina en la resolución de la anemia y de la respuesta inflamatoria, a excepción de la haptoglobina.

En los perros del Grupo M todas estas proteínas inflamatorias sufrieron una modificación que no fue significativa, salvo en el caso de la haptoglobina que se redujo a lo largo de todo el periodo de estudio. La diferencia en la normalización de la haptoglobina entre ambos grupos de tratamiento podría ser debida al tipo de metabolismo que sufren ambos fármacos.

En relación a los parámetros renales, ninguno de los dos tratamientos modificó la tasa de filtración glomerular pero en los perros del Grupo G aumentaron los niveles plasmáticos de creatinina después del tratamiento (D0-D30) y en el Grupo M hasta el final del seguimiento (D30-D90). Además, en el primer grupo se observó una reducción de los niveles de urea y fósforo a lo largo de todo el periodo de estudio (D0-D90).

La tasa de filtración glomerular, evaluada mediante el aclaramiento de la creatinina exógena, permitió detectar pacientes con lesión renal que mantuvieron valores normales de creatinina plasmática, evaluar además la evolución de la funcionalidad renal en pacientes que presentaban una reducción de la misma antes del tratamiento y en pacientes que previamente habían sufrido un fracaso renal agudo y confirmar el mantenimiento de la filtración en pacientes con proteinuria.

La reducción del ratio proteína/creatinina en orina fue más significativa en el Grupo G que en el Grupo M. Sin embargo, en el Grupo G la electroforesis de proteínas en orina (SDS-PAGE) reveló un aumento del porcentaje de proteínas de bajo peso molecular después del tratamiento lo cual puede indicar una lesión tubular previa producida por los antimoniales. Para diferenciar que estas proteínas tienen origen tubular y no son inmunoglobulinas de cadena ligera (lo cual querría decir que estos pacientes siguen eliminando globulinas en orina), sería necesario determinar marcadores específicos de lesión tubular. Sin embargo, en el Grupo M, se observó un aumento del porcentaje de proteínas de alto peso molecular y una reducción del porcentaje de las proteínas de bajo peso molecular a lo largo de todo el estudio. Este último hallazgo podría confirmar la tubulopatía en el Grupo G, ya que si a pesar de que la miltefosina es menos eficaz en el control de la respuesta inflamatoria y humoral, los pacientes de este grupo eliminan menos inmunoglobulinas por la orina, obviamente el efecto de los antimoniales sobre estas proteínas urinarias será mayor. Para confirmar la presencia de globulinas en orina en el futuro se podría realizar un Western blot de las bandas correspondientes al bajo peso molecular.

Finalmente, y aunque son necesarios nuevos estudios con un número mayor de pacientes en ambos grupos, de los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que el antimonio de meglumina es más eficaz que la miltefosina en la resolución de las alteraciones inflamatorias, de la anemia y de la respuesta humoral relacionadas con Lcan, pero que puede ser potencialmente nefrotóxico. Por ello es recomendable emplear métodos laboratoriales específicos para la valoración de la función renal en los pacientes que vayan a ser tratados con este fármaco.

2.- SUMMARY

2.- SUMMARY

Canine leishmaniosis (CanL) is a zoonotic parasitic disease (enzootic in the Mediterranean basin) caused by the intracellular protozoan *Leishmania infantum* and transmitted by sandflies of the genus *Phlebotomus*. The disease is characterized by a heterogeneous clinical presentation in which renal pathologic conditions are often the principal cause of death. CanL associated nephropathy is mainly characterized by glomerular damage and is primarily attributed to intraglomerular deposition of circulating immune complexes. The combination of meglumine antimoniate and allopurinol is so far considered to be the most effective therapy for CanL, but some studies have shown that a combination of miltefosine and allopurinol has similar efficacy. Nevertheless, meglumine antimoniate has shown some deleterious effects on the kidney.

Infected dogs treated for leishmaniosis frequently do not achieve parasitological cure and may suffer several relapses. Monitoring of the patient's serology and serum proteins variation, have been used to follow up response to treatment. Normalization of serum protein electrophoresis occurs parallel to clinical improvement and can be used as a marker of a positive response and early detection of relapses; during the first months of therapy, serology is less useful because the decline of antibody titration is rather slow. In this sense, new parameters such acute phase proteins, have been investigated as alternative and it seems that they could be used as early markers for disease as well as for monitoring the response to treatment in canine leishmaniosis.

In the present study two main objectives were pursued. The first one was to evaluate and compare the effects of the two main treatments used to manage dogs with CanL (meglumine antimoniate/allopurinol versus miltefosine/allopurinol) and their potential relationship with various clinicopathological abnormalities. For this purpose we have measured the main hematological, biochemical, serological and parasitological parameters employed in daily practice (complete blood count, creatinine, urea, ALT, calcium, phosphorus and plasma proteins electrophoresis, IFAT, bone marrow cytology and PCR), as well as the most representative acute phase proteins namely serum C reactive protein, haptoglobin, ferritin and paraoxonase-1. Our second objective was to evaluate potential impact of these two treatments on kidney function. For this purpose three laboratory tools were employed; creatinine glomerular filtration rate (considered the gold standard for kidney function evaluation) was determined both at the beginning and two months after finishing treatment. Plasma creatinine, complete urinalysis and urinary protein/creatinine ratio were also monitored. Finally sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of urinary proteins were performed to further characterize potential kidney disease.

A total of 20 dogs presented at the Veterinary Teaching Hospital of the Universidad Complutense of Madrid were included into the study. All dogs were positive to CanL by

Indirect Immunofluorescence (IFAT); diagnosis was confirmed by qualitative and quantitative bone marrow or lymph node aspirates by PCR and qPCR. Dogs were allocated in two different leishmanicide treatment groups (meglumine antimoniate or miltefosine both in combination with allopurinol as a leishmanistatic drug).

All dogs showed marked improvement of clinical signs, with no differences between the two treatment groups. There was also no difference between groups in lowering of antibody titration by IFAT but meglumine antimoniate therapy was better in normalizing serum protein electrophoretic pattern throughout the study period.

Meglumine antimoniate was also more effective in resolution of anemia and of the inflammatory response as reflected by acute phase proteins's variation.

Concerning renal function, none of the two treatments modified glomerular filtration rate, but meglumine antimoniate significantly increased plasma creatinine concentrations.

Reduction of UPC ratio by meglumine antimoniate along the study was significant in comparison to miltefosine. However, an increase of the percentage of low molecular weight urinary proteins was observed in the meglumine antimoniate group, highly suggesting a tubular lesion induced by this principle active.

From these results obtained on this study, we might conclude that meglumine antimoniate is more effective than miltefosine in resolution of the inflammatory derangements related to CanL but it can be potentially nephrotoxic. For that reason, it is highly recommended to carry out more specific tests for screening of kidney function before starting treatment for CanL with this drug.

3.- INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

3.- INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La leishmaniosis canina (Lcan) es una enfermedad grave que afecta a humanos, animales domésticos y salvajes, y es común en muchos países de la cuenca mediterránea. Es producida por protozoos del género *Leishmania* y transmitida por insectos dípteros del género *Phlebotomus*.

En zonas donde la leishmaniosis se considera endémica, los pacientes afectados pueden presentar una gran variedad de cuadros clínicos desde formas subclínicas hasta signos clínicos generalizados (Miró y cols., 2008). En este sentido la respuesta inmune del hospedador juega un papel muy importante en la evolución de la infección (Pinelli y cols., 1999; Barbieri y cols., 2006; Dantas Torres 2007., Panano y cols., 2009).

Aunque la combinación de antimonio de meglumina con alopurinol se considera el tratamiento más efectivo para Lcan (Solano-Gallego y cols., 2009), otros estudios han demostrado que la miltefosina administrada conjuntamente con el alopurinol tiene una eficacia similar al tratamiento de primera línea (Miró y cols., 2009). Sin embargo ninguno de estos dos fármacos está exento de efectos secundarios (Shaw y cols., 2009).

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como la presencia de una lesión estructural o funcional en uno o ambos riñones durante un periodo largo de tiempo, habitualmente tres meses o más (Polzin., 2011); siendo la consecuencia final una reducción en el número de nefronas funcionales debido a cambios patofisiológicos en los glomérulos, túbulos, vasos e intersticio renal y por consiguiente una reducción de la tasa de filtración glomerular y pérdida de la homeostasis (Nelson y Couto., 2009). La severidad de la ERC en el perro está relacionada con la glomeruloesclerosis y la lesión tubulointersticial (Yabuqui y cols., 2010). La ERC es la enfermedad renal más común en el perro (Polzin y cols., 2005) habiéndose descrito una prevalencia en UK del 0,37% (O'Neil y cols., 2013). El riesgo asociado de padecer ERC varía con los estudios consultados e incluye la edad, estar asegurado, la raza (Cocker spaniel, Cavalier King Charles) y padecer otras enfermedades como problemas cardíacos (O'Neil y cols., 2013).

La enfermedad renal debido a la glomerulonefritis y nefritis intersticial es una complicación de la leishmaniosis visceral y ocurre en más del 96% de los perros enfermos (Benderitter y cols., 1988). Como consecuencia, el fallo renal es una de las causas principales de muerte en los perros con Lcan (Koutinas y cols., 1999). La ventaja frente a otros pacientes que sufren ERC es que en este caso sabemos la causa y por lo tanto podemos tratar la etiología. De hecho las alteraciones renales pueden ser reversibles si se administra un tratamiento temprano (Sayari y cols., 2008). Sin embargo la experiencia clínica nos demuestra que alguno de los pacientes que acuden a la consulta por primera vez ya presenta alteraciones analíticas y signos clínicos de lesión renal. Este hecho, junto con los efectos secundarios de los fármacos leishmanicidas, en

ocasiones limita las posibilidades terapéuticas frente al agente causal e implica la implementación del tratamiento con terapias nefroprotectoras y los controles renales subsiguientes (Goldstein y cols., 2013).

Una de las principales limitaciones del diagnóstico precoz de la lesión renal es que la creatinina plasmática, uno de los parámetros en los que se basa la Sociedad Internacional de Interés Renal (IRIS), es un marcador poco sensible ya que se altera cuando se ha perdido el 75% de la funcionalidad renal (Finco y cols., 1995).

Todo ello refuerza la necesidad del diagnóstico precoz de la enfermedad renal en un paciente con Lcan. En la enfermedad renal producida por Lcan una titulación elevada de anticuerpos tiene una sensibilidad predictiva positiva del 98% de padecer glomerulonefritis (Goldstein y cols., 2013). Sin embargo de cara a futuras recaídas, y sobre todo en pacientes que no muestran alteraciones analíticas, sería interesante saber el grado de lesión del que partimos y si ésta empeora al finalizar el tratamiento. Toda esta información la podemos obtener, como han demostrado diversos autores, mediante el estudio histopatológico de las muestras renales seriadas obtenidas por biopsia (Aresu y cols., 2012). Sin embargo a pesar de la recomendación de realizar biopsia renal de cara a clasificar correctamente la lesión y aplicar un tratamiento individualizado, en la clínica diaria no es una práctica muy común ya que los propietarios no suelen acceder a llevarla a cabo especialmente en pacientes sin signos clínicos renales asociados. Además, este tipo de pruebas tampoco están indicadas en todos los pacientes con glomerulonefritis, aunque se consideren una técnica potencialmente útil (Littman y cols., 2013). Por ello desde el punto de vista clínico resultaría más práctico encontrar un biomarcador en orina o en plasma que nos pudiera facilitar esta información y se correlacionara al máximo con el grado de lesión renal. En la clínica disponemos del aclaramiento de creatina exógena que se considera la prueba más específica para determinar la funcionalidad renal.

En este sentido en los últimos tiempos Lcan ha servido como modelo de lesión renal en la investigación de nuevos biomarcadores que se anticipan a la creatinina en la detección de la lesión renal (Palacio y cols., 1997; García-Martínez y cols., 2015). Por ejemplo el patrón electroforético de las proteínas eliminadas por la orina permite conocer el lugar de la nefrona (glomérulo o túbulo) en el que se ha producido la lesión o si se ha producido en ambos (patrón mixto). Independientemente de la causa, la función renal se correlaciona mejor con los cambios tubulointersticiales como la fibrosis intersticial, la degeneración y atrofia tubular, pérdida de capilares peritubulares y finalmente la destrucción de la funcionalidad de la nefrona (Eddy., 2005). La detección precoz de la lesión, mediante la separación de las proteínas eliminadas por la orina, y de la alteración de la función tubulointersticial permite una intervención más temprana que ralentice la progresión de la enfermedad y por lo tanto mejore la esperanza de vida (Nabity., 2010a).

En el presente estudio describimos la evolución clínica de un grupo de pacientes enfermos de Lcan sometidos a dos protocolos de tratamiento diferentes, mediante la monitorización periódica de la exploración física; los parámetros hematológicos, bioquímicos (ALT, urea, creatinina, calcio y fósforo) y urinarios (densidad urinaria, UPC y electroforesis de proteínas en orina); la electroforesis de proteínas plasmáticas, IFI y carga parasitaria (PCR aninada y qPCR en médula y en orina) y de los marcadores de inflamación (Prot.CR, haptoglobina, ferritina y paranoxanasa-1).

4.- OBJETIVOS

4.- OBJETIVOS

En este trabajo de Tesis Doctoral se plantearon dos objetivos principales:

- Evaluar y comparar el efecto de las dos combinaciones terapéuticas más utilizadas en Lcan (antimoniales/alopurinol y miltefosina/alopurinol) sobre la respuesta humoral, carga parasitaria y respuesta inflamatoria sistémica asociada a esta enfermedad y su relación con los parámetros clínicopatológicos. Para ello se determinaron en tres tiempos diferentes (día del diagnóstico, 30 y 90 días después de iniciar el tratamiento), los parámetros laborales y bioquímicos empleados habitualmente en la clínica diaria (inmunofluorescencia indirecta, electroforesis de proteínas plasmáticas, hemograma completo, ALT, urea, creatinina, proteínas totales plasmáticas, calcio y fósforo séricos), parámetros indicativos de la carga parasitaria (PCR anidada y PCR cuantitativa y citología de aspirados de médula ósea, así como ambas PCRs en orina), y las proteínas de fase aguda más representativas: albúmina, proteína C reactiva, haptoglobina, ferritina y paraoxonasa-1.
- Valorar el impacto que estos dos tratamientos tuvieron sobre la función renal. Para ello se determinaron el aclaramiento de creatinina exógena como técnica específica de valoración de la función renal antes del tratamiento y al final del estudio, y la determinación de la ratio proteína/creatinina urinario, concentración plasmática de creatinina y urianálisis completo. Con el fin de caracterizar mejor la posible lesión renal asociada a la enfermedad y/o a los tratamientos empleados, se realizaron también electroforesis en gel de poliacrilamida de orina, de todos los pacientes incluidos en el estudio, antes y después del tratamiento.

5.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1.- Leishmaniosis canina

5.1.1. Etiología y biología

La Leishmaniosis canina (Lcan) está producida por el protozoo *Leishmania infantum* que es transmitido por insectos flebotomos, siendo el perro (*Canis familiaris*) el principal reservorio peridoméstico en el ciclo de este parásito en toda la cuenca mediterránea.

Leishmania infecta células fagocíticas mononucleares, siendo un protozoo intracelular obligado.

Durante el ciclo biológico del parásito los macrófagos cutáneos fagocitan los promastigotes, formas flageladas que son inoculadas por el insecto vector, y en ellos se desarrolla el amastigote, una forma que ha perdido el flagelo. Los amastigotes se multiplican dentro del macrófago, provocan su ruptura y una vez liberados son capturados por otras células fagocíticas. La repetición de este proceso lleva a la diseminación de los amastigotes a diferentes tejidos en los perros infectados. Las hembras de flebotomo se infectan al ingerir sangre con macrófagos y amastigotes. En el intestino medio del vector, el parásito se vuelve a transformar en promastigote, se multiplica y migra hacia la probóscide. En esta migración sufre diferentes modificaciones hasta convertirse en promastigotes metacíclicos o formas infectantes. Cuando el parásito realiza otra ingesta de sangre, los parásitos pasan a la sangre del hospedador y se completa el ciclo (Solano-Gallego y cols., 2011).

5.1.2. Patogenia

La presencia o ausencia de signos clínicos está relacionada con el tipo de respuesta inmunitaria que desarrolla cada paciente, que puede ser de tipo celular o humoral. De manera que los animales que no desarrollan enfermedad desarrollan una respuesta inmunitaria producida por linfocitos T CD4+, tipo Th 1, los cuales liberan, entre otras citoquinas, IFN gamma y TNF alfa que activan los macrófagos permitiendo la eliminación del parásito y el control de la infección. Estos pacientes apenas presentan respuesta inmunitaria humoral y aunque infectados se denominan clínicamente sanos. Sin embargo, los perros enfermos se caracterizan por presentar una reducida o ausente respuesta inmunitaria celular y una exagerada respuesta humoral tipo Th2 con una incapacidad de respuesta por parte de los linfocitos T, que no es eficaz para controlar la infección (Baneth y cols., 2008).

Los signos clínicos presentes en perros con leishmaniosis son producidos por dos mecanismos patogénicos:

1.- Una inflamación que puede ser macrofágica, linfocítica o linfoplasmocelular, en los lugares donde se multiplica el parásito formando granulomas parasitarios. Este mecanismo da lugar a

las manifestaciones clínicas en piel, hígado, intestino, huesos y mucosas (Paltrinieri y cols., 2010a).

Esta inflamación engloba una serie de procesos, entre los que se encuentran la generación y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) cuyo fin último es inactivar al parásito. Cuando la producción de sustancias oxidantes excede la capacidad antioxidante del organismo, las células y los tejidos pueden sufrir lesiones oxidativas. A este proceso se le conoce como estrés oxidativo.

Inicialmente el parásito tiene la capacidad de inhibir la producción de sustancias oxidantes en los fagocitos, lo que le permite sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos (Panano y cols., 1998). Pero a medida que se desarrolla la respuesta inflamatoria los neutrófilos producirán radicales de oxígeno y otras sustancias oxidantes, en ocasiones de manera más intensa que en otra reacción inflamatoria (Paltrinieri y cols., 2010b). La acumulación de estos ROS, en caso de no ser controlados por el sistema antioxidante, dará lugar a lesiones biomoleculares fundamentalmente en los lípidos.

Los pacientes con signos clínicos muestran mayor estrés oxidativo que los que padecen infección subclínica (Heidarpour y cols., 2012). Sin embargo la medición de las especies reactivas de oxígeno no es un marcador fiable en el diagnóstico de esta enfermedad (Paltrinieri y cols., 2010b). Se ha demostrado que en presencia de la infección la estimulación del metabolismo oxidativo de los neutrófilos no varía con la gravedad de la enfermedad (moderada Leish tipo II o grave Leish tipo IV) (Solano-Gallego y cols., 2011) y es independiente de uremia; sin embargo, la viabilidad espontánea de los neutrófilos se ve afectada por la uremia, lo cual ocurre en etapas finales de la enfermedad (Almeida y cols., 2013).

2.- El depósito de inmunocomplejos (IC) (principalmente inmunoglobulinas tipo G y M). En este sentido se han descrito dos tipos de reacciones de hipersensibilidad. La hipersensibilidad de tipo II se produce debido a reacciones mediadas por la interacción de un anticuerpo con el antígeno presente en la superficie de las células y otros componentes tisulares, tanto en forma de citotoxicidad mediante células dependientes de anticuerpo como por reacciones dependientes de complemento. La hipersensibilidad de tipo III se asocia con el depósito de inmunocomplejos circulantes en los tejidos provocando activación de fagocitos y daño tisular. Algunos pacientes también pueden desarrollar autoanticuerpos dando lugar a procesos como una trombocitopenia inmunomediada (Baneth y cols., 2012). Debido a este mecanismo aparecen lesiones renales, oculares, articulares y vasculares (Blavier y cols., 2001; Costa y cols., 2003; Peña y cols., 2000) que se traducen en signos de uveítis, poliartritis, vasculitis y enfermedad renal. Todos estos signos son de peor pronóstico que los producidos por granulomas inflamatorios.

5.1.2.1.- Lesión renal inducida por el parásito

La Lcan se considera un modelo natural de enfermedad renal (Cortadellas y cols., 2009) ya que causa diferentes grados de enfermedad glomerular que pueden dar lugar a una enfermedad renal crónica.

La lesión renal en los perros infectados se asocia tanto a la presencia de IC (Nieto y cols., 1992) como a la activación de inflamomas glomerulares y fenómenos de autofagia (Esch y cols., 2015).

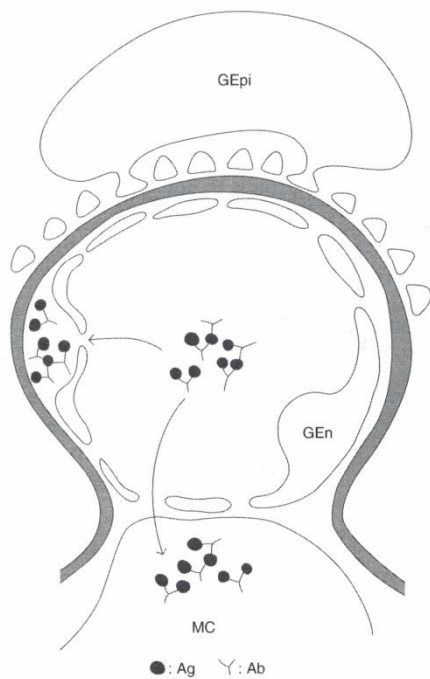
En la mayoría de las glomerulonefritis la lesión ocurre de manera secundaria a la formación de IC. El tipo de lesión inducida por los IC dependerá de cuatro factores: del mecanismo de formación, del lugar de formación, de la composición y cantidad de depósito. Por otro lado algunas características del riñón facilitan el depósito de IC en los glomérulos; por ejemplo el hecho de que reciba el 25% del gasto cardiaco, que la presión intrarrenal sea más alta que en otros lechos vasculares, que los capilares glomerulares proporcionen una gran superficie permeable a través de la cual puedan circular los IC sistémicos y que los endotelios vasculares estén cargados negativamente facilitando la unión de moléculas cargadas positivamente.

Normalmente el depósito de IC se produce en el mesangio y en el lado subendotelial de la pared vascular (Esquema 1). Esto es así porque los IC circulantes tienen un elevado peso molecular que les impide atravesar la pared capilar intacta. Sin embargo, en ocasiones los complejos subendoteliales se pueden disociar para cruzar la membrana basal, volviéndose a formar con una distribución subepitelial (Esquema 2).

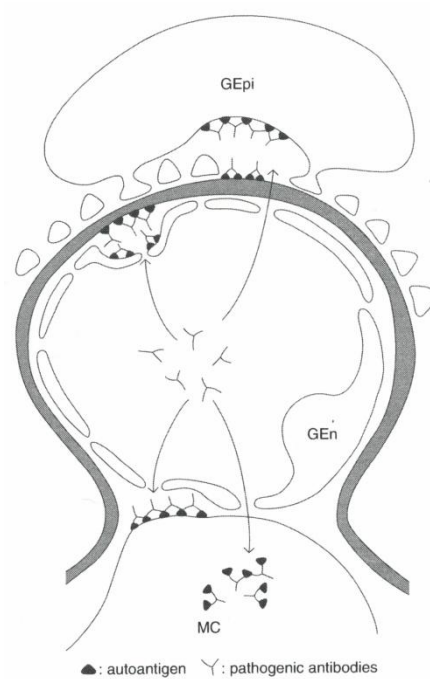
A medida que aumenta el tamaño y la insolubilidad de los IC, éstos tienen más capacidad para activar el complemento que intentará eliminarlos de la circulación; de manera que los de tamaño medio serán los que se eliminen peor y al mismo tiempo los que permanecerán unidos a su receptor iniciando la lesión glomerular.

Las células inflamatorias circulantes, como los neutrófilos y las plaquetas, tienen muy buena accesibilidad a los IC depositados en el subendotelio causando una lesión endotelial grave, activación de sustancias procoagulantes, depósito de fibrina y lesión exudativa. El depósito mesangial lesiona y activa las células mesangiales residentes, que producirán citoquinas y matriz extracelular. El depósito subepitelial, típico de nefropatías membranosas, se caracteriza por una lesión de los podocitos, mediada por el complemento, y por la ausencia de reacción inflamatoria; esto es así porque estos IC están separados de la circulación por la membrana basal lo cual también dará lugar a que las sustancias inflamatorias liberados por los podocitos sean transportados en la orina por las fuerzas de filtración, en vez de a la circulación (Nangaku y cols., 2005).

Aunque tradicionalmente se ha considerado al hígado como fuente principal del complemento, varios estudios han demostrado que, algunas células renales y células inmunes derivadas de la médula ósea, pueden producir una gama completa de proteínas del complemento. De esta manera en respuesta a una lesión, el complemento derivado del riñón (o complemento local) puede iniciar, amplificar y reparar la lesión renal (Vieyra y cols., 2010). Tanto la activación del complemento sistémico como del local darán lugar a la producción de C5b-9, que producirá tanto lesión en los podocitos como en otras células glomerulares mediante diferentes mecanismos. De manera que la proteinuria originada en las nefritis membranosa será la consecuencia de la lesión de la membrana basal producida por las sustancias oxidantes y proteasas derivadas de los podocitos, así como por los cambios en el citoesqueleto de los podocitos inducidos por el complejo C5b-9 (Nangaku y cols., 2005).



Esquema. 1



Esquema. 2

Esquema 1: Depósito de inmunocomplejos en el mesangio y en el espacio subendotelial.

Esquema 2: Depósito de inmunocomplejos en el mesangio, espacio subendotelial y subepitelial.

Fuente: Nangaku y cols., 2005.

Aparte de la lesión derivada de la presencia de IC, la correlación positiva entre los marcadores de oxidación y los marcadores renales (urea y creatinina) confirman la existencia de un estrés oxidativo y una peroxidación lipídica como mecanismo de lesión renal en pacientes con Lcan

(Heidarpour y cols., 2012). En concreto, los leucocitos que infiltran el glomérulo generan ROS, fundamentalmente H_2O_2 (Johson y cols., 1987).

Como se ha comentado al principio la activación de los fenómenos de autofagia (inflammasomas) para eliminar los tanto IC como los detritus celulares, puede ser una posible fuente de IL-1B e IL-18. Estas interleuquinas poseen un papel quimiotáctico y proinflamatorio muy importante correlacionado con la enfermedad renal inflamatoria, lesión por reperfusión e isquemia (Anders y cols., 2011). Esch y cols (2015) han demostrado el incremento tanto de inflammasomas (ASC y NLRP3) como de IL-1B en pacientes infectados por *Leishmania*.

Los riñones están afectados probablemente en todos los perros con leishmaniosis (Bianciardi y cols., 2009). Aunque en menor medida, los pacientes infectados clínicamente sanos (ICS) pueden presentar el mismo tipo de lesión renal histológica que los enfermos (hipercelularidad mesangial, hipersegmentación glomerular, nefritis intersticial y depósito de colágeno) (Esch y cols., 2015). Incluso los pacientes no proteinúricos pueden presentar una glomerulonefritis mesangioproliferativa con nefritis tubulointersticial (Plevraki y cols., 2006). En este sentido, y aunque estudios anteriores mostraban cierta controversia en cuanto al tipo de componente depositado en el glomérulo (Poli y cols., 1991; Costa y cols., 2010); Esch y cols., 2015 han demostrado no solo la presencia de IgG, IgM y C3b glomerular si no que están presentes en mayor cantidad en pacientes ICS y enfermos que en los pacientes control.

La enfermedad renal puede progresar desde una proteinuria subclínica hasta un síndrome nefrótico o ERC con glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial y amiloidosis (Koutinas y cols., 1999). Histológicamente la lesión renal se ha clasificado como glomerulonefritis mesangial, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa y glomerulonefritis focal segmental (Costa y cols., 2003; Aresu y cols., 2008). La nefritis tubulointersticial ha sido descrita por diferentes autores con una incidencia diferente, pero nunca como una lesión aislada (Aresu cols, 2008b), considerándose una consecuencia de la progresión de la lesión glomerular inmunomediada, que es la lesión primaria clásica (Zatelli y cols., 2003).

5.1.3.-Diagnóstico

Los objetivos del diagnóstico son confirmar la enfermedad y detectar perros infectar perros ICS que vivan o viajen a zonas endémicas; así como donantes de sangre de las mismas áreas (Solano Gallego y cols., 2011). El diagnóstico de infección no es sinónimo de enfermedad ya que la mayoría de los perros infectados no desarrollan la enfermedad (Baneth y cols., 2008; Paradies y cols., 2010; Solano Gallego y cols., 2011, Paradies y cols., 2012).

El diagnóstico de Lcan es complejo por ello es necesario el uso integrado de todos los resultados obtenidos. Las técnicas diagnósticas actuales carecen de una sensibilidad y una especificidad del 100% (Solano Gallego y cols., 2009).

5.1.3.1.- Diagnóstico clínico:

La infección por *L. infantum*, en perros susceptibles, progresa durante un periodo de tiempo variable hacia un cuadro clínico que puede ser muy diverso.

La linfadenomegalia periférica y las lesiones cutáneas, especialmente la dermatitis exfoliativa, deberían considerarse como las únicas manifestaciones clínicas presentes de manera consistente en al menos el 50% de los casos (Noli y Saidomichelakis, 2014).

Otros hallazgos incluyen pérdida de peso y apetito, intolerancia al ejercicio, astenia, atrofia muscular, poliuria y polidipsia, esplenomegalia, vómitos, diarrea, lesiones oculares, artritis y cojeras (Solano-Gallego y cols., 2009). En estados avanzados el paciente puede llegar a morir por enfermedad renal.

5.1.3.1.1.- Alteraciones clínicopatológicas:

El hemograma suele caracterizarse por la presencia de anemia normocítica, normocrómica y no regenerativa, leucocitosis o leucopenia y trombocitopenia (Foglia Manzillo y cols., 2013; Noli y Saridomichelakis., 2014).

En el perfil hepatorenal destacan la elevación de las enzimas hepáticas y azotemia renal (Slappendel., 1988; Rallis y cols., 2005; Reis y cols., 2006a).

En el proteinograma podemos observar hiperproteinemia sérica, hiperglobulinemia policlonal (beta y gamma), hipoalbuminemia y eversión de la ratio albúmina/globulinas (Slappendel., 1988; Rallis y cols., 2005; Solano Gallego y cols., 2009).

En el urianálisis es frecuente encontrar proteinuria glomerular ($UPC \geq 0,5$) (Palacio y cols., 1995)

5.1.3.1.2.- Diagnóstico diferencial:

El diagnóstico diferencial debería establecerse en animales enfermos que presenten un cuadro clínico compatible con Lcan y, sin embargo, los resultados de las pruebas sean dudosos o negativos.

Muchas enfermedades pueden presentarse como procesos concomitantes, asociados a la inmunosupresión o a la transmisión vectorial, pudiendo agravar el cuadro clínico (Mozos y cols., 1999).

En nuestras latitudes, la enfermedad más frecuentemente asociada a la Lcan es la ehrlichiosis.

5.1.3.2.- Diagnóstico parasitológico:

5.1.3.2.1.- Observación microscópica de la citología

La citología es una prueba diagnóstica concluyente y la más sencilla y que se puede emplear en las clínicas veterinarias debido a su bajo coste, el poco material que requiere, la rápida obtención de los resultados y la elevada especificidad (Saridomichelakis y cols., 2005, 2009).

Consiste en la observación microscópica de amastigotes de *Leishmania* en extensiones de material aspirado, principalmente médula ósea, linfonódulo y/o piel, teñidas mediante métodos convencionales (Giemsa, May-Grunwald, Diff-Quick).

La sensibilidad de estas técnica en biopsias de médula óseas no es muy elevada (60-75%), aunque es superior al linfonódulo (30-50%) (Alvar y cols., 2004).

5.1.3.2.2.- Cultivo en medio específico

El medio de cultivo más idóneo es el NNN (Novy-Nicolle-McNeal), no comercializado, que consiste en una mezcla de agar sangre de conejo al 15% con una fase líquida proveniente del agua de condensación originada al solidificarse el medio. A pesar de que posee una especificidad más elevada que la citología no se emplea en la práctica clínica, pero sí en laboratorios de investigación especializados.

5.1.3.2.3.- Aislamiento en animales de laboratorio

Esta técnica es de utilidad para aislados de *Leishmania* de difícil crecimiento o a partir de inóculos contaminados. El inóculo se puede inyectar por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intradérmica o intracardiaca en ratones o cricetos para demostrar posteriormente la infección experimental en los órganos hematopoyéticos.

5.1.3.2.4- Xenodiagnóstico

Esta técnica se basa en detectar y aislar el patógeno a partir de flebotomos alimentados sobre el hospedador objeto de estudio. El perro sospechoso previamente sedado, se expone a la picadura del flebotomo, durante una hora, con el fin de demostrar posteriormente la presencia de promastigotes en el tubo digestivo de los flebotomos, bien mediante observación microscópica o bien evidenciando ADN de *Leishmania* por técnicas moleculares (Molina, 1994; Grammiccia, 2011). A pesar de su elevada sensibilidad y especificidad, únicamente es aplicable en laboratorios especializados que mantengan una colonia experimental de flebotomos (Molina y cols., 1994; Maia y Campino, 2008)

5.1.3.2.5.- Histopatología

Los amastigotes de *Leishmania* también pueden observarse en cortes histopatológicos de biopsias de piel o cualquier órgano infectado teñidos con hematoxilina y eosina. Aunque los

amastigotes se reconocen fácilmente (Roura y cols., 1999) puede sospecharse de una inflamación piogranulomatosa, granulomatosa o linfoplasmocitaria en el tejido observado (Petanides y cols., 2008).

5.1.3.2.6.- Inmunohistoquímica

Las técnicas de inmunohistoquímica, como la inmunoperoxidasa o la inmunofluorescencia directa de los tejidos, pueden ayudar a identificar o confirmar la presencia de parásitos, particularmente en órganos con baja carga parasitaria o cuando los parásitos no son identificables de forma clara mediante microscopia óptica (Maia y Campino, 2008).

5.1.3.2.7- Diagnóstico molecular: Reacción en cadena de la polimeras (PCR)

La detección de ADN de *Leishmania* en tejidos mediante PCR permite un diagnóstico sensible y específico detectando la infección antes que la seroconversión (Straus-Ayali y cols., 2004).

5.1.3.2.7.1- El tejido de elección

Debido al tropismo variable del parásito por los diferentes tejidos, la sensibilidad de la técnica varía entre ellos (Maia y Campino, 2008) y no se ha alcanzado ningún consenso sobre cuál es la muestra de elección (Lombardo y cols., 2012).

Las muestras en las que se ha observado una mayor sensibilidad incluyen la médula ósea, el linfonódulo, el bazo, la piel y la conjuntiva, mientras que la sensibilidad es menor en sangre, capa leucocitaria y orina (Solano-Gallego y cols., 2011).

5.1.3.2.7.2.- Tipos de PCR

a) PCR convencional (cPCR)

El resultado de la cPCR es una variable discreta con dos posibles valores: positivo y negativo; por lo tanto no permite cuantificar el ADN obtenido, viéndose reducida su utilidad cuando se requiere una monitorización precisa de la carga parasitaria.

b) PCR aninada o nested

Es una variación de la cPCR en la que se emplean dos grupos de cebadores en dos reacciones de PCR sucesivas, estando la segunda reacción destinada a amplificar el producto obtenido en la primera reacción de PCR, aumentando la sensibilidad y especificidad.

c) PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La qPCR está reemplazando a la cPCR y PCR anidada en el diagnóstico y seguimiento de muchas enfermedades, ya que se realizan detecciones muy sensibles, rápidas, precisas y reproducibles del ADN específico presente en la muestra analizada (Francino y cols., 2006).

Existen dos tipos de detección por fluorescencia: agentes intercalantes y sondas específicas con fluorocromos.

5.1.3.3.- Diagnóstico inmunológico:

5.1.3.3.1.- Detección de la respuesta inmunitaria humoral

El diagnóstico inmunológico de Lcan se basa principalmente en la detección de IgG frente al parásito. La muestra más habitual es el suero donde sus concentraciones se correlacionan bien con el cuadro clínico y con la parasitemia (Reis y cols., 2006b).

Un nivel elevado de anticuerpos junto con un cuadro clínico compatible suele ser suficiente para establecer el diagnóstico definitivo de Lcan (Solano-Gallego y cols., 2009). No obstante la presencia de niveles bajos de anticuerpos puede observarse en perros con una respuesta celular específica, siendo necesario la realización de pruebas diagnósticas complementarias para confirmar o descartar la enfermedad (Noli y Saridomichelakis., 2014).

Una de las mayores desventajas de las técnicas serológicas la constituyen las reacciones cruzadas frente a otros patógenos.

Existen diversas técnicas serológicas para el diagnóstico de la Lcan, las cuales pueden dividirse en cualitativas y cuantitativas.

a) Técnicas cuantitativas

1.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Es la técnica diagnóstica más empleada de manera rutinaria por los veterinarios clínicos (Bourdeau y cols., 2014) y ha sido considerada tradicionalmente como la técnica de referencia para el diagnóstico serológico por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) debido a su alta sensibilidad y especificidad (Maia y Campino, 2008). Sus inconvenientes son la subjetividad de la lectura y la pérdida de sensibilidad en animales ICS (Mettler y cols., 2005).

En los casos dudosos la fiabilidad del resultado aumenta si se realizan varias determinaciones con intervalos de 30-45 días, en los que se observará una seroconversión, o si se realizan dos técnicas diferentes (Ferrer y cols., 1995).

2.- ELISA (Enzimoimmunoensayo)

Es un test específico cuya sensibilidad es superior a la técnica de IFI (Rodríguez-Cortes y cols., 2013). La sensibilidad y especificidad pueden oscilar entre 80 y 99,5% y entre 81 y 100% respectivamente (Marcondes y cols., 2013).

3.- Técnica de aglutinación directa (DAT)

Se emplean promastigotes completos y teñidos, bien en suspensión o en forma liofilizada para la detección de la respuesta humoral frente a los antígenos de superficie de *Leishmania*. Es un método de bajo coste, sencillo y de fácil manejo, aunque su sensibilidad (93-97,7%) es inferior a la del IFI y ELISA y su especificidad es más baja (95%) (Schalling y cols., 2004).

4.- Immunoblotting Western Blot (WB)

Detecta anticuerpos frente a fracciones antigénicas específicas del parásito. Se ha empleado para evaluar la fase de la infección en la que se encuentra el animal y la respuesta al tratamiento (Fernández-Pérez y cols., 1999).

Posee una sensibilidad mayor que el IFI y es capaz de discriminar fases tempranas de la enfermedad en animales con resultados negativos mediante IFI y/o ELISA (Aisa y cols., 1998).

5.- Citometría de flujo

Es una técnica rápida y precisa que permite cuantificar, examinar y clasificar partículas microscópicas suspendidas en una corriente de flujo con IgG frente a promastigotes de *Leishmania* (Maia y Campino, 2008). Posee una sensibilidad del 95-100% y una especificidad del 100%.

b) Técnicas cualitativas

Existen diversos análisis inmunocromatográficos o *dispticks* y cada uno difiere en el antígeno y conjugado empleados (Paltrinieri y cols., 2010a). Fundamentalmente se basan en el antígeno rK39, disponible en el mercado en forma de tiras de papel impregnadas en antígeno (Mettler y cols., 2005). Dichos kits son fáciles de usar y rápidos. A pesar de presentar una especificidad media alta, su sensibilidad oscila entre 30-70% (Reithinger y cols., 2002) lo que incrementa el número de resultados falsos negativos al ser incapaces de detectar perros con niveles bajos de anticuerpos, por lo que en casos sospechosos con resultados negativos debería realizarse un método serológico cuantitativo (Solano-Gallego y cols., 2011).

5.1.3.3.2.- Detección de la respuesta inmunitaria celular

La respuesta inmune celular específica frente a *Leishmania* en perros es un indicador crucial de la respuesta protectora Th1 (Fernández-Bellon y cols., 2005).

De momento están poco estandarizadas y sólo son aplicables con fines de investigación.

5.1.4.- Tratamiento y efectos secundarios de los fármacos

Actualmente la combinación de moléculas leishmanicidas con alopurinol (leishmanioestático) es el tratamiento de elección en los perros enfermos de leishmaniosis, siendo los antimoniales

pentavalentes, seguidos de la miltefosina, los protocolos reconocidos como más eficaces (Miró y cols., 2008; Solano-Gallego y cols., 2009; Oliva y cols., 2010; Solano-Gallego y cols., 2011).

5.1.4.1.- Leishmanicidas:

A.- Antimoniales pentavalentes:

De este grupo los fármacos más comúnmente utilizados, debido a su menor toxicidad, son los antimoniales pentavalentes, en concreto el *antimoniato de nmetil-glucamina*.

La biodisponibilidad de los antimoniales administrado vía SC se acerca al 100%, alcanzado su concentración máxima entre 3-5 h y reduciéndose a niveles cercanos al límite de detección a las 18 h postinyección. En el estudio de Tassi (1994) la vida media plasmática fue de 121±6 minutos. Después de la administración SC y entre 6-9 h posteriores a su administración, más del 80 % es eliminado vía renal mediante filtración glomerular (Tassi y cols., 1994; Belloli y cols., 1995) por eso se recomienda una segunda dosis diaria para conseguir una concentración inhibitoria del fármaco durante la mayor parte del día (Valladares y cols., 1996). Aunque la vía renal es casi la única vía de eliminación (Hantson y cols., 2000); no se han desarrollado aún guías de recomendación para ajustar la dosis en animales con enfermedad renal.

Actualmente la pauta de administración recomendada es de 75-100 mg/kg por vía SC en una sola dosis diaria, o 45-75 mg/kg SC dos veces al día durante 4-6 semanas, considerándose la primera línea de tratamiento cuando se combina con alopurinol (10 mg/kg VO, cada 12 h. sin interrupción, un mínimo de 12 meses) (Solano-Gallego y cols., 2011). La combinación de ambos fármacos posee una acción sinérgica, permitiendo administrar dosis inferiores durante menos tiempo.

La toxicidad causada por los antimoniales es debida a la unión a grupos sulfhidrilo (-SH) y la alteración de la estructura terciaria de las proteínas y de los lugares de acción de numerosas enzimas, dando lugar a la aparición de signos clínicos de estibointolerancia y/o estibointoxicación. La primera es de aparición precoz, independiente de la sobredosis y en medicina humana se manifiesta por cambios de temperatura, artralgias, vómitos, tos seca y erupciones cutáneas. La estibointoxicación ocurre incluso después del cese del tratamiento y puede afectar al corazón, hígado, riñón, páncreas y sistema circulatorio; estando la gravedad de los signos clínicos relacionada con la dosis total administrada (Katlama y cols., 1985). La nefrotoxicidad asociada al fármaco se debe a una necrosis tubular o enfermedad glomerular vinculada al depósito de IC (Giraud y cols., 1970). En medicina humana se han reportado estos efectos adversos en el 21% de los pacientes tratados con antimoniales por vía intramuscular (Masmoudi y cols., 2005). Biancardi y cols (2009) demostraron en perros sanos tratados con antimoniato de metilglucamina mostraron cambios morfológicos consistentes con lesión tubular grave, a pesar de no mostrar ningún signo clínico de enfermedad renal.

En los perros tratados con antimoniales puede ocurrir un empeoramiento del cuadro clínico al principio del tratamiento y aumento del nivel de anticuerpos, debido a la liberación masiva de antígeno originado por la muerte parasitaria que obliga, en algunas ocasiones, a cesar el tratamiento por unos días hasta que se reinicia, a veces con dosis más bajas hasta la total recuperación del perro (Miró, 2014).

En medicina veterinaria no se ha demostrado la cardiotoxicidad del fármaco en pacientes caninos, aunque Luciani y cols (2013) detectaron dos pacientes que desarrollaron efectos adversos durante la administración del fármaco (pancreatitis y fallo renal agudo) con un aumento de la troponina I cardíaca a los 60 días

Aunque la administración de antimoniales se ha asociado al desarrollo de pancreatitis, Xenoulis y cols (2014) demostraron que ninguno de los 20 perros tratados en combinación con alopurinol presentó signos clínicos de pancreatitis ni aumentos de la lipasa pancreática sérica específica (SpecPL) por encima del límite superior.

Aunque se ha estudiado la formulación liposomal de antimoniales (Oliva y cols., 1995) por el momento no se han comercializado debido a su elevado coste, a la dificultad técnica de preparación y a los efectos adversos asociados a su administración IV (Ribeiro y cols., 2008).

B.- Alquilfosfolípidos

B.1.- Miltefosina

En 2007 se registró en Europa el primer principio activo para el tratamiento oral de la Leishmaniosis canina, la miltefosina (1-O-hexadecilfosfocolina).

Originalmente este fármaco se desarrolló como agente antineoplásico (Hilgard y cols., 1993) pero además demostró capacidad parasitocida *in vitro* e *in vivo* tanto frente a los promastigotes como a los amastigotes de varias especies de *Leishmania* (Croft y cols., 1996).

La vida media de eliminación de la miltefosina en perros es de 153 horas (153+13,7 h) o 6,3 días, por ello cabe esperar que en 3-4 semanas de tratamiento se consigan unos niveles plasmáticos estables. Al final del tratamiento la eliminación se completa en cuatro semanas. La distribución de la mitefosina es amplia, metabolizándose lentamente en el hígado (Berman., 2005) y excretándose por las heces. Por lo tanto el riñón es una ruta menor de eliminación de este fármaco.

Los mecanismos de acción de la miltefosina no se conocen totalmente. Parece que se incorpora a la bicapa lipídica de la membrana plasmática del parásito, aumentando su permeabilidad y alterando el metabolismo de los alquil-lípidos (Lux y cols., 2000). Otra hipótesis es que provoca una alteración de la membrana flagelar de los promastigotes así como defectos en la síntesis de

fosfolípidos (Santa-Rica y cols., 2000). En cualquier caso, finalmente provoca muerte celular por apoptosis (Paris y cols., 2004).

Los efectos secundarios inducidos por la miltefosina son fundamentalmente gastrointestinales (nauseas, anorexia, vómitos y diarrea) (Mateo y cols., 2009), dosis dependiente, que se reducen cuando se administra con el alimento y desaparecen al retirar el tratamiento. Woerly y cols (2009) describieron que el 11,7% de los efectos secundarios eran debidos al fármaco, siendo más frecuente la aparición de vómitos.

La miltefosina ha mostrado efectos teratógenos, embriotóxicos y fetotóxicos por lo que está contraindicado su empleo en hembras gestantes y lactantes (Murray cols., 2000).

Biarciardi y cols (2009) demostraron en perros sanos mediante el estudio de biopsias renales tomadas antes (día -1) y después del tratamiento (día 55) que a diferencia de la miltefosina, los antimoniales inducen lesiones renales confirmadas tanto mediante microscopia óptica como electrónica.

Actualmente la combinación de miltefosina y alopurinol se considera la segunda línea de tratamiento de Lcan (Noli y Saridomichelakis., 2014) y ha demostrado ser tan eficaz clínicamente como el protocolo estándar basado en el tratamiento con antimoniales de meglumina y alopurinol (Miró y cols., 2009).

B.2- Oleilfosfocolina (OIPC)

La oleilfosfocolina pertenece al grupo químico de las alquilfosfocolinas y es un análogo estructural de la miltefosina.

Los estudios de bioseguridad en perros con OIPC indican que se puede administrar a dosis de 1,5 mg/kg/día durante 28 días sin causar efectos adversos ni toxicidad. Dosis de 4 y 8 mg/kg produjeron alteraciones digestivas (Fortin., 2013).

Las ventajas que presenta esta molécula en el tratamiento de la leishmaniosis son su biodisponibilidad oral, su bajo coste, amplio margen de seguridad y gran eficacia clínica y parasitológica (Miró, 2014; Hernandez y cols., 2014). Son necesarios ensayos clínicos a gran escala para una mejor valoración de su aplicación clínica.

C.- Anfotericina B:

La anfotericina B es un antibiótico derivado de los polienos obtenidos a partir del actinomiceto *Streptomyces nodosus* (Dutcher y cols., 1956). Este fármaco actúa provocando la permeabilización de la membrana plasmática del parásito por interacción selectiva con el ergosterol presente en la misma (ausente en las células de los mamíferos), formando poros acuosos que favorecen la pérdida de pequeños cationes, como K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , lo que origina la muerte del parásito (Kinsky, 1970).

Actualmente, en su forma liposomal, se considera el fármaco más eficaz en el tratamiento de la leishmaniosis humana, a pesar de su nefrotoxicidad, y por ello el consenso en medicina veterinaria es evitar su uso excepto en casos excepcionales (Solano-Gallego y cols., 2011) para evitar, en la medida de lo posible, la presentación de futuras resistencias.

En los trabajos llevados a cabo por Cortadellas y cols (2003) y Lamothe (2001) observaron una elevada eficacia clínica y los efectos adversos reportados fueron anorexia, vómitos y una elevación reversible en los niveles séricos de creatinina.

La anfotericina B encapsulada en liposomas es menos tóxica y más eficaz en humanos (Gradoni y cols., 2003) se ha empleado en algunos casos en perros pero su uso tampoco está recomendado en medicina veterinaria al ser el tratamiento de elección en medicina humana (Ciaramella y Corona., 2003).

5.1.4.2.- Leishmanioestáticos:

Alopurinol

El alopurinol es un análogo de la hipoxantina, que es metabolizado por las leishmanias para producir un análogo inactivo de inosina. Éste es incorporado en el ARN del parásito causando la formación de sustancias tóxicas que conllevan a un error en la síntesis proteica, actuando como parasitostático (Baneth y Shaw., 2002).

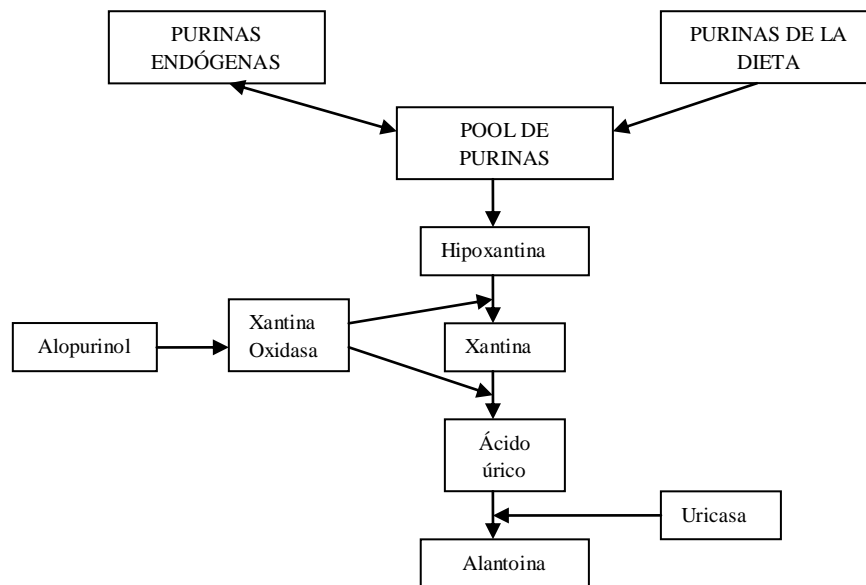
El alopurinol es una sustancia probablemente no nefrotóxica que se utiliza en combinación con los dos fármacos anteriores, y después en monoterapia durante un periodo más prolongado de tiempo, fundamentalmente para prevenir las recidivas (Denerolle y Bourdoiseau., 1999; Mateo., 2007).

La dosis habitualmente empleada es de 10 mg/kg/día VO repartida en 2 tomas como terapia de mantenimiento a largo plazo, entre 12 y 18 meses (Miró., 2014).

El efecto adverso más importante que se le atribuye es cristaliuria por xantina (Pelvraki y cols., 2006). En este estudio observaron que los pacientes que recibieron como único tratamiento alopurinol no se produjo ningún cambio en el tipo de lesión renal ya presente antes del tratamiento, los pacientes con y sin proteinuria y no azotémicos experimentaban una mejoría significativa de la lesión tubulointersticial; mientras que los pacientes que recibieron tratamiento placebo mostraron un empeoramiento de esta lesión. En relación a los parámetros renales los pacientes proteinúricos experimentaron una reducción significativa del UPC, mientras que los no proteinúricos que recibieron placebo mostraron un aumento del mismo parámetro.

La xantina es un producto del metabolismo de las purinas que se convierte en ácido úrico mediante la enzima xantina oxidasa (Esquema 3), que es inactivada mediante su unión al

alopurinol. La xantina es la purina menos soluble, por ello la xantinuria está asociada a la formación de cálculos.



Esquema 3: Metabolismo de las purinas

A pesar de sus escasos efectos adversos se recomienda monitorizar la función hepática y renal durante su uso prolongado (Torres y cols., 2011) e incluso realizar ecografías abdominales para detectar nefrolitiasis en pacientes con tratamientos prolongados (Miró., 2014).

5.1.4.3.- Antibióticos

El uso de antibióticos en el tratamiento de la Lcan debe considerarse siempre un apoyo y nunca como primera elección.

A.- Aminosidina

La aminosidina es un aminoglucósido con actividad antimicrobiana y antiprotozoaria. Su mecanismo de acción consiste en alterar la asociación de la subunidad ribosomal y producir una disfunción respiratoria en los promastigotes (Davidson y cols., 2009).

Se ha utilizado a la dosis de 5 mg/kg/24h vía SC durante 3 semanas, combinado con antimonio de meglumina 60 mg/kg/12h IM durante 4 semanas (Oliva y cols., 2010).

Este fármaco produce toxicidad renal y ototoxicidad, estando contraindicado su uso en pacientes con enfermedad renal (Ciaramella y Corona., 2003).

B.- Pentamidina

Es una diamidina aromática utilizada en el tratamiento de la tripanosomosis y que fue considerada durante años el tratamiento de segunda elección en la leishmaniosis humana (Oliva y cols., 2010).

Su mecanismo de acción parece consistir en la alteración del metabolismo de las proteínas y ácidos nucleicos, desorganizando el ADN, con el que las diamidinas forman complejos.

La dosis empleada en perros es de 4 mg/kg IM en 3 dosis semanales durante 5-7 semanas o 20 inyecciones en días alternos (Rhalen y cols., 1999).

Su uso está limitado al coste y a los efectos adversos agudos graves (irritabilidad muscular en el punto de inoculación, hipotensión, náuseas, vómitos, salivación, diarrea, shock anafiláctico), como crónicos (hipoglucemia, diabetes mellitus, daño hepato-renal, trombocitopenia) (Ciaramella y Corona., 2003).

C.- Quinolonas

C.1.- Marbofloxacin

Es una fluoroquinolona de tercera generación que posee actividad leishmanicida *in vitro* a través del FNT- α y la vía iNOS resultando en la producción de NO₂ por los macrófagos, eliminando de esta manera a los amastigotes (Vouldoukis y cols., 2006).

El protocolo más comúnmente usado consiste en la administración de 2 mg/kg/24h VO durante 28 días (Rougier y cols., 2008).

C.2.- Enrofloxacin

Es una fluoroquinolona que estimula la actividad leishmanicida de los macrófagos *in vitro* mediante la generación de óxido nítrico.

Solo se recomienda su empleo en perros con leishmaniosis clínica para tratar infecciones bacterianas secundarias cutáneas (Bianciardi y cols., 2004).

D.- Derivados del imidazol

D.1.- Metronidazol

Es un derivado del grupo de los nitroimidazoles con propiedades antibacterianas, antiprotozoarias y antiinflamatorias *in vitro*. En algunos estudios se ha administrado asociado a la espiramicina (Pennisi y cols., 2005) y enrofloxacin (Bianciardi y cols., 2008) con respuestas clínicas variables pero con escasa eficacia leishmanicida.

D.2.- Ketoconazol

Se ha empleado a dosis de 25 mg/kg/día VO estando su uso contraindicado en pacientes con azotemia (Bianciardi y cols., 2004).

5.1.4.4.- Inmunoterapia

A.- Fármacos inmunosupresores:

Los más empleados son los glucocorticoides que actúan inhibiendo la inmunidad humoral y celular. Sólo se recomienda su uso cuando aparecen lesiones concomitantes como uveítis y poliartritis (Ciaramella y Corona., 2003).

B.- Fármacos inmunoestimulantes

B.1.- Domperidona

La domperidona es un principio activo empleado tradicionalmente como antiemético y procinético, que es un antagonista de los receptores de dopamina D2, dando lugar a la liberación de serotonina y ésta a su vez estimulando la liberación de prolactina. El aumento en las concentraciones plasmáticas de prolactina genera un incremento en CD4+Th1 y en las interleuquinas (IL)-2, IL-12, interferon (INF)- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- α , activando los natural killer (NK) y los macrófagos, seguido de un descenso de CD4+Th2 y TNF-B. Estudios recientes han comprobado que en pacientes seropositivos que presentaban signos clínicos, la administración de domperidona a dosis de 0,5 m/kg/12h durante un mes, produjo una mejoría clínica en el 86% y un descenso en el título de anticuerpos en el 38% de los pacientes. Además se observó un aumento de la inmunidad celular (Gómez Ochoa y cols., 2007).

Como efecto secundario la domperidona puede producir galactorrea a los 7-9 días del inicio del tratamiento (Sabaté y cols., 2014). No atraviesa la barrera hematoencefálica por lo que los efectos sobre el sistema nervioso central son muy improbables (Matera y Mori, 2000).

Recientemente se ha comercializado en el mercado veterinario en forma de suspensión oral con la indicación de la prevención y tratamiento de la leishmaniosis canina en pacientes con enfermedad moderada.

B.2.- Autovacuna

En 2012 se comercializó en España una autovacuna para el tratamiento de la leishmaniosis canina. Su mecanismo consiste en una activación de la respuesta inmune celular.

Las ventajas del tratamiento son su eficacia clínica y parasitológica, y compatibilidad con otros tratamientos, así como su seguridad hepática y renal. Sin embargo hacen falta más estudios para valorar su eficacia y seguridad (Hernandez y cols., 2013)

Su desventaja son los costes y la dificultad de seguimiento ya que los anticuerpos producidos no son discriminados por las técnicas serológicas convencionales.

B.3.- Levamisol

Este fármaco no se utiliza de rutina y siempre debe ir asociado al tratamiento convencional.

5.1.5. Profilaxis

El control de esta enfermedad se hace mediante el diagnóstico precoz, el tratamiento de los perros infectados, el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas, la aplicación de vacunas y la lucha antivectorial.

5.2.-FISIOPATOLOGÍA RENAL

La unidad funcional del riñón es la nefrona, existiendo distintos tipo de nefronas que se clasifican en función de su penetración en la médula renal como superficiales corticales y yuxtaglomerulares.

El aporte sanguíneo renal corre a cargo de la *arteria renal* que se divide en *a. interlobares* hasta llegar a la unión corticomedular. En esta región las *a. interlobares* se ramifican para formar las *a. arcuatas*, que discurren a lo largo de la región corticomedular paralelas a la cápsula renal. Estas últimas arterias terminarán radiando las *a. interlobulares*. Las arteriolas aferentes glomerulares son ramificaciones de las *a. interlobulares* y darán lugar a una red de capilares dentro del glomérulo, que finalmente se unirán de nuevo para formar la *arteriola eferente glomerular*. Las arteriolas eferentes a su vez se volverán a dividir para formar el *plexo capilar peritubular*. Además las arteriolas eferentes de las nefronas yuxtaglomerulares se dividirán para formar la *vasa recta descendente* que entra en la médula. Por otro lado desde el plexo capilar medular se forma la *vasa recta ascendente*, dando lugar junto con la descendente, a un mecanismo de intercambio a contracorriente.

La función renal se clasifica en glomerular y tubular. Mientras que el glomérulo lleva a cabo la filtración del plasma para eliminar las sustancias tóxicas del organismo, a lo largo de los túbulos renales el ultrafiltrado sufrirá fenómenos de reabsorción y secreción para formar finalmente la orina.

5.2.1.- Filtración glomerular

Morfología glomerular (Esquema 4)

Los glomérulos renales están formados por una red de capilares íntimamente relacionados con la cápsula de Bowman.

La **barrera de filtración glomerular** está formada por el endotelio vascular, la membrana basal y el epitelio visceral.

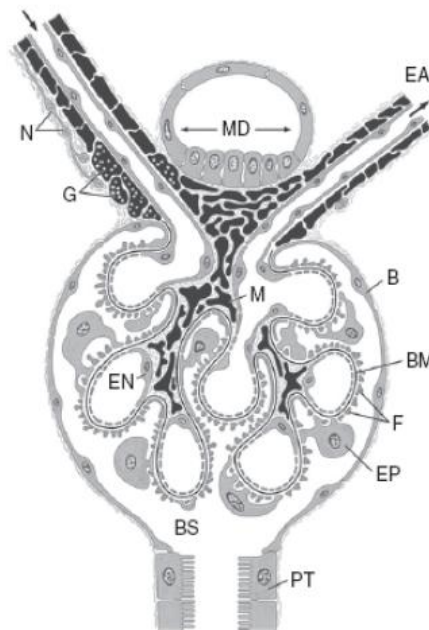
1.- *El endotelio vascular* (EN) presenta fenestraciones de entre 50-100 nm, que evita la filtración de células pero no impide que, en función de su tamaño, algunas macromoléculas aparezcan en el ultrafiltrado. El aspecto luminal del endotelio está tapizado por sialoglicoproteínas cargadas negativamente, filtro iónico.

2.- *La membrana basal* (BM) glomerular está compuesta por la lámina rara interna del lado endotelial, la lámina densa y la lámina rara externa del lado epitelial. La primera y la última lámina contienen proteínas no colágenas polares que contribuyen a la carga negativa de la barrera de filtración; mientras que la lámina densa contiene proteínas de colágeno no polares que contribuyen al filtro por tamaño de la barrera de filtración.

3.- Las células epiteliales viscerales o podocitos (EP) forman la capa más externa de la barrera de filtración. Los podocitos cubren la membrana basal glomerular y los capilares glomerulares del lado urinario, con sus procesos interdigitales primarios y secundarios. La hendidura de filtración entre los procesos interdigitales mide 10-30 nm. Además de tener función fagocítica los podocitos están revestidos por sialoglicoproteínas cargadas negativamente, filtro iónico.

Por lo tanto la barrera glomerular evita de manera selectiva la filtración por carga y por tamaño. Así las moléculas con radio superior a 4 nm no deberían aparecer en la orina. La albúmina sérica que tiene un peso molecular de 69 kDa y un radio de 3,6 nm, penetra mínimamente. Por otro lado las moléculas cargadas negativa y positivamente presentan, respectivamente, mayor y menor restricción de filtración que las neutras.

La función normal de la barrera de filtración depende de la estructura y función normal de cada componente así como del estado hemodinámico (D'Amico y Bazzi, 2003).



Esquema 4: Esquema de la estructura glomerular. AA= Arteria aferente, AE= Arteria eferente, BS= espacio de Bowman, PT= túbulo proximal, B= cápsula de Bowman, G= células granulares, N= terminales nerviosas simpáticas, M= mesangio, EN= células endoteliales, EP= células epiteliales, P= procesos de los podocitos, BM= membrana basal, MD= mácula densa. Fuente: Dibartola, 2012. 4ª ed.

El **mesangio (M)** es un entramado celular que no forma parte de la barrera de filtración y que estabiliza el glomérulo en su polo vascular. Está en contacto con la membrana basal en las zonas en las que no hay endotelio capilar y al mismo tiempo rellena el espacio entre la mácula densa y las arteriolas glomerulares, formando parte de esta manera del *aparato yuxtaglomerular*. El mesangio sintetiza prostaglandinas que contribuyen a la vasodilatación renal, es fuente de

macrófagos y además contiene microfilamentos que se contraen en respuesta a la secreción de hormonas específicas, alterando la superficie disponible de filtración.

Determinantes de la filtración glomerular

La tasa de filtración glomerular (TFG) se refiere a la tasa de filtración total de ambos riñones y representa la suma de las tasas de filtración de todas las nefronas.

El producto de la filtración glomerular es un ultrafiltrado plasmático que contiene agua y cristaloides en cantidad semejante al plasma, pero que está libre de proteínas.

Los cambios en la resistencia de la arteriola aferente y eferente pueden afectar a la TFG, y está regulada por el sistema nervioso autónomo y mediadores vasoactivos.

Flujo sanguíneo renal y flujo plasmático renal

Los riñones reciben el 25% del gasto cardiaco del cual, en el perro, el 90% lo recibe la corteza renal, menos del 10% la zona medular externa y sólo entre el 2-3%, la zona medular interna.

El riñón tiene un sistema de autoregulación que le permite mantener prácticamente constante, variación menor del 10%, la TFG y el flujo sanguíneo renal (FSR) con presiones de perfusión entre 80-180 mmHg. Esta autorregulación se lleva a cabo a través de la vasoconstricción de la arteria aferente en respuesta al aumento de la presión de perfusión y al flujo de ClNa a través de la concentración o transporte de ClNa en el túbulo contorneado distal detectado por el aparato yuxtaglomerular.

5.2.2.- Función tubular renal

El sistema tubular de la nefrona se divide en túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y túbulo colector.

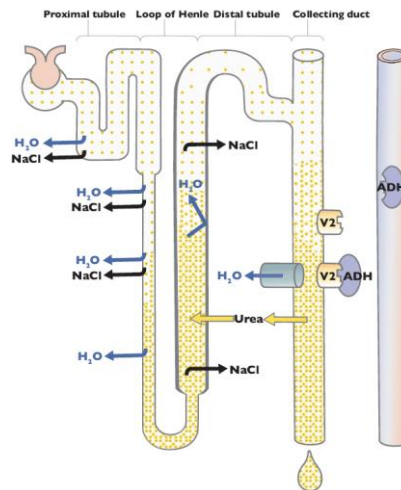
El túbulo renal tiene la función de reabsorber y secretar sustancias. La reabsorción es el movimiento de agua y solutos desde el lumen tubular al intersticio peritubular; mientras que la secreción ocurre en sentido contrario. Algunas sustancias pueden experimentar reabsorción en una parte de la nefrona y secreción en otra.

La reabsorción tubular puede ocurrir a través de cuatro formas de transporte: difusión pasiva, difusión facilitada, transporte activo primario y secundario.

Requiere especial mención la pinocitosis que consiste en la captación de células o partículas demasiado grandes para difundir a través de la membrana celular. Las proteínas de bajo peso molecular (ej. hormonas e inmunoglobulinas de cadenas ligeras) son hidrolizadas a aminoácidos por las enzimas del borde en cepillo en el aspecto luminal de las células tubulares proximales. Después los aminoácidos experimentan cotransporte con el Na. Las proteínas de elevado peso molecular experimentan endocitosis en la membrana celular luminal. Estos endosomas se unen

con los lisosomas para formar endolisosomas en los cuales se produce la digestión de las proteínas. Los aminoácidos dejan el endolisosoma y cruzan la membrana basolateral de la célula tubular mediante difusión facilitada. En el paciente sano este mecanismo de endocitosis tiene alta capacidad y no se satura.

Mecanismo de concentración urinario (Esquema5)



Esquema 5: Transporte de solutos y permeabilidad al agua. Fuente: James y Lunn. Compendium 2007.

La concentración de la orina se produce en dos pasos en las *nefronas yuxtamedulares*. Inicialmente la absorción de sodio sin agua, en la parte ascendente del asa de Henle, hace al intersticio medular hiperosmolar y al fluido que llega a los túbulos colectores corticales hiposmótico. Posteriormente, la vasopresina (ADH) aumenta la permeabilidad pasiva al agua en los *tubos colectores corticales* de manera que el fluido tubular que atraviesa este segmento de la nefrona se equilibra osmóticamente con el intersticio hiperosmolar. Los túbulos colectores presentan permeabilidad activa al sodio, de manera que la cantidad de agua pasivamente reabsorbida dependerá de cuanta reabsorción activa de sodio se lleve a cabo. Finalmente el volumen de fluido que llega a los *túbulos colectores medulares* es muy reducido e isoosmótico en relación al plasma. Este mismo fluido es muy rico en urea, la cual se cede al intersticio medular permitiendo el último paso en la concentración de la orina mediante el equilibrio osmótico del fluido tubular con el intersticio hiperosmótico. La ADH aumenta la permeabilidad de la urea en este segmento tubular.

La *vasa recta* previene la disipación del gradiente osmótico medular eliminando el agua reabsorbida mediante el intercambio contracorriente.

La orina pasa de los túbulos colectores a la pelvis renal, siendo almacenada y eliminada a través las vías excretoras.

5.2.3.- Función endocrina de los riñones

Los riñones tienen un papel esencial en la regulación de la producción de células rojas en la médula ósea, en el mantenimiento del volumen del fluido extracelular y en el mantenimiento de la homeostasis del calcio.

En relación a la producción de células rojas, el mayor estímulo para la síntesis de *eritropoyetina* (EPO) es el descenso del aporte de oxígeno a los riñones.

La función principal del *eje renina angiotensina aldosterona* (RAA) es la regulación del volumen del fluido extracelular a través de la homeostasis del sodio.

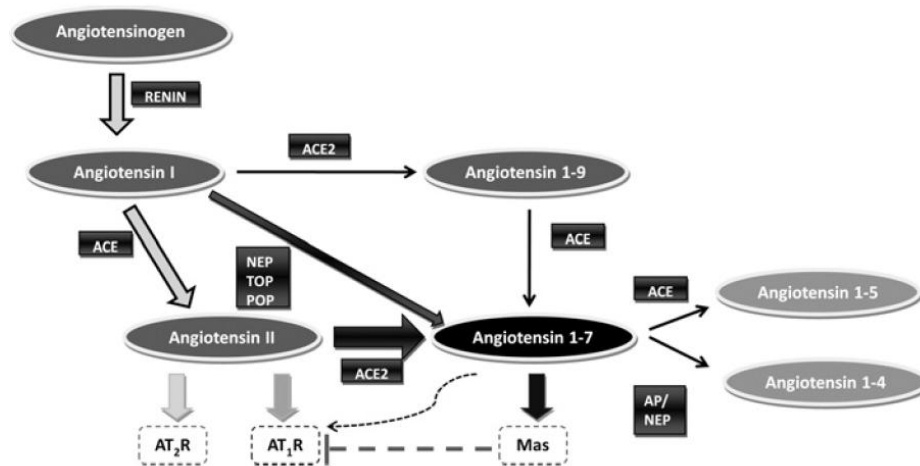
La renina se produce fundamentalmente en las células del aparato yuxtaglomerular y su liberación está relacionada con la reducción de la presión de perfusión renal, aumento del tono simpático y de las catecolaminas circulantes en respuesta a la estimulación de los baroreceptores arteriales y cardiacos; y por cambios en el flujo tubular distal y eliminación de cloro.

La renina convierte el angiotensinógeno, sintetizado en el hígado, en angiotensina I y ésta a su vez es transformada en angiotensina II por la enzima de conversión de la angiotensina (ECA).

La angiotensina II produce vasoconstricción arteriolar en múltiples órganos, aumentando la presión sistémica; facilita la liberación de norepinefrina y aumenta la sensibilidad a la misma en el músculo liso vascular; aumenta la reabsorción tubular proximal de sodio; aumenta la secreción de aldosterona; produce vasoconstricción de las arterias aferentes y eferentes renales, afectando más a las eferentes; produce constricción del mesangio glomerular reduciendo la superficie de filtración y estimula la liberación de prostaglandinas vasodilatadoras.

Mitani y cols (2015) demostraron que la cantidad de ECA, que se detecta fundamentalmente en las células tubulares, es menor en pacientes con ERC que en pacientes sanos. Esta reducción es mayor en la zona medular externa y contrasta con el esperable aumento de la actividad del eje RAA en pacientes con ERC. La ECA 2 es un nuevo miembro del eje RAA, se co-localiza con la ECA y aunque también se encuentra disminuida en la zona medular externa, aumenta en la interna en paciente con ERC. En este estudio, Mitani y cols (2015) demostraron la estrecha relación entre el eje ECA/ECA2 y la lesión en el perro. En medicina humana diversos estudios han demostrado que el eje RAA está formado por dos ejes con efectos opuestos. El primer eje está constituido por la enzima ECA, la Ang II como producto final y el receptor AT 1 (ECA/ Ang II/ AT1). El segundo eje está constituido por la Ang 1-7, originada de la hidrólisis de la Ang II mediada por la ECA 2, y el receptor Mas (ECA 2/ Ang 1-7/ Mas). La activación del eje ECA 2/ Ang 1-7/ Mas reduce la función de las células inflamatorias y la fibrinógenesis; en concreto a la Ang 1-7 se le atribuyen efectos renoprotectores al estar implicada en la modulación del estrés oxidativo, activación e influjo de leucocitos y fibrosis del tejido renal. Los datos que aportan los estudios realizados en medicina humana señalan el efecto beneficioso

de la activación de este segundo eje en pacientes con enfermedad renal e incluso se especula que la administración IECA y BRAs (bloqueantes de receptores de angiotensina) aumentan las concentraciones plasmáticas de Ang 1-7. De todo ello se concluye que la administración de fármacos que imiten la actividad del eje ECA 2/ Ang 1-7/ Mas puede ser beneficiosa en enfermedades renales crónicas con componente inflamatorio, fibrótico y proliferativo (Simoes e Silva y cols., 2012). (Esquema 6).



Esquema 6: Formación y degradación de la AG 1-7 en el riñón. Fuente: Zimmerman, 2012.

La vitamina D3 o colecalciferol se obtiene a través de la dieta o de la radiación ultravioleta. El hígado hidroxila el colecalciferol a 25-hidroxicolecalciferol. En los riñones éste último se convierte, a través de la enzima 25-hidroxicolecalciferol 1 α reductasa, en la forma activa 1,25 dihidroxicolecalciferol o *calcitriol*. El calcitriol aumenta la reabsorción del calcio (Ca) y fósforo (P) en el intestino, ejerce un efecto permisivo sobre la resorción ósea de Ca y P mediado por la paratohormona (PTH) y un control *feedback* negativo sobre la síntesis de PTH y su secreción en las glándulas paratiroides.

5.3.- Marcadores de función renal

En los últimos años se ha dado mucha importancia al estudio de nuevos marcadores de lesión renal. Esta necesidad surge del hecho de que los parámetros que rutinariamente se valoran en plasma como determinantes de la función renal (urea y creatinina), se alteran cuando se ha perdido ya el 75% de la funcionalidad renal (Finco y cols., 1995); es decir, son marcadores de funcionalidad renal poco sensibles (Braun y cols., 2003) y además pueden modificarse por causas extrarrenales (Braun y Lefebvre., 2008).

Numerosos investigadores han valorado la utilidad de diferentes marcadores tanto en suero como en orina, y algunos consideran que los marcadores urinarios son más sensibles para detectar lesión renal que los séricos y tienen el potencial de detectar tanto la localización como la gravedad de la lesión. Estos marcadores son un grupo de proteínas cuya concentración en orina viene determinada por la permeabilidad de la barrera glomerular y/o la recaptación de la proteína en las células tubulares, así como por la capacidad de estas células para degradarlas (D'Amico, 2003; Raila y cols., 2005). Por otro lado, algunos factores extrarrenales como el flujo plasmático renal, la presión hidráulica en el espacio de Bowman e incluso la reserva renal, podrían mantener los valores de los marcadores séricos en el rango normal cuando exista daño en las nefronas (De Zeeuw, 2013).

Aún a pesar de la gran variedad de biomarcadores disponibles, se ha sugerido que no es adecuado definir la lesión renal aguda con un único biomarcador, debido a la propia heterogeneidad renal y a la disparidad de escenarios en los cuales puede ocurrir el daño renal (Rifai y cols., 2006; Dieterle y cols., 2010).

5.3.1.- Marcadores de función glomerular

5.3.1.1.- Marcadores clásicos de función glomerular

5.3.1.1.1.- Marcadores directos: Tasa de filtración glomerular (TFG)

La función excretora del riñón se puede dividir en función glomerular (filtración) y función tubular (secreción y absorción). A través de la combinación de estos procesos el riñón mantiene el volumen y composición del fluido extracelular. La TFG se considera la prueba *gold standard* de valoración de la masa renal funcional y se puede medir mediante la determinación en orina (aclaramiento urinario) o en plasma (aclaramiento plasmático) de determinados marcadores administrados por vía intravenosa (Linnetz y Graves., 2010).

Las situaciones en la práctica clínica en las que puede interesar monitorizar éste parámetro son: detectar si existe o no enfermedad renal en pacientes que padecen enfermedades extra- renales que alteran la concentración de la orina (ej. hipercalcemia, diabetes *mellitus*); excluir la enfermedad renal como causa de polidipsia/poliuria, en pacientes con niveles de creatinina en el

límite superior de la normalidad o con nefropatías hereditarias (Von Hendy-Willson y cols., 2010); determinar la respuesta al tratamiento de determinadas endocrinopatías que reducen la TFG, como el hipotiroidismo (Panciera y Lefebre, 2009; Gommeren y cols., 2009); monitorizar la toxicidad renal de ciertos fármacos (Sasaki y cols., 2014) o para ajustar la dosis de fármacos que se eliminan por vía renal en pacientes nefropáticos (Von Hendy-Willson y cols., 2010); establecer el grado de lesión renal en pacientes proteinúricos (Cortadellas y cols., 2008) y como técnica de validación de otros biomarcadores renales (Almy y cols., 2002).

El término *aclaramiento* se refiere al volumen de un fluido completamente limpio de una sustancia; el aclaramiento no mide la cantidad de sustancia eliminada sino la velocidad de limpieza del fluido. Por otro lado el aclaramiento plasmático total es la suma de todas las rutas de aclaramiento (Heiene y Moe., 1998) mientras que el aclaramiento urinario es el volumen de plasma limpio de una sustancia, la cual aparece en la orina (Peters., 1991). Ambos pueden diferir porque no todas las sustancias aclaradas en el riñón aparecen en la orina.

El marcador administrado por vía intravenosa según Heine y Moe (1998), tiene que cumplir unas determinadas características, que:

- se filtre libremente por el glomérulo.
- no se secrete, absorba o metabolice en los túbulos renales.
- no se una a proteínas plasmáticas.
- no entre en los eritrocitos.
- no siga otras rutas de aclaramiento.
- no altere por sí mismo la TFG.

A la hora de analizar la TFG y debido a que los valores "normales" están poco definidos, es importante que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia. Esto es así debido a la variación de protocolos descritos así como la influencia de ciertos factores como el ciclo circadiano, el estado de hidratación del paciente, la concentración de proteínas en la dieta y el uso de protocolos de sedación durante la determinación de la TFG (Von Hendy-Wilson, 2010).

1.- Aclaramiento urinario:

La inulina es el marcador más utilizado para llevar a cabo este tipo de aclaramiento (Peters., 1991). Es un polímero de fructosa que se elimina mediante filtración glomerular, no es reabsorbido ni metabolizado por el riñón. Durante el procedimiento se administran inulina vía intravenosa y se recoge toda la orina producida en las 24 h siguientes.

$$\text{Aclaramiento de inulina} = \frac{\text{producción de orina} \times \text{concentración de inulina en orina}}{\text{concentración de inulina en plasma}}$$

Los valores de referencia de aclaramiento de inulina descritos en perros son $3,39 \pm 0,73$ a $4,60 \pm 0,15$ ml/kg/min (Krawiec y cols., 1986; Izzat y cols., 1989).

La principal limitación asociada al aclaramiento urinario es que requiere que el paciente esté sondado o en una jaula metabólica. Es por ello que este tipo de técnicas no se usa en la clínica habitual.

2.- Aclaramiento plasmático:

2.a.- Creatinina:

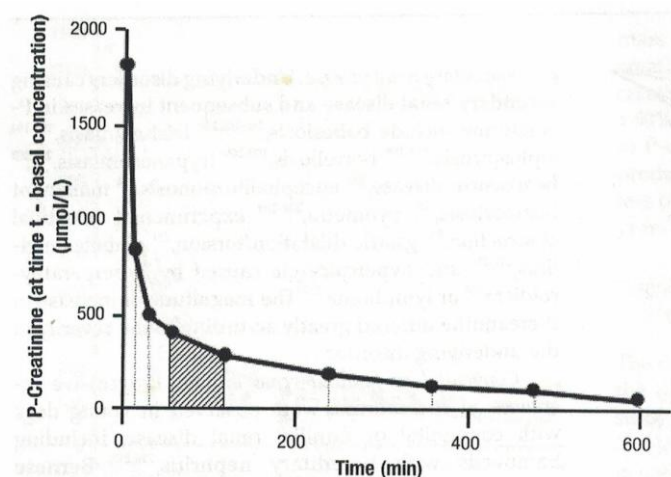
La determinación de la TFG se puede llevar a cabo midiendo la creatinina endógena y exógena, en plasma y en orina. El aclaramiento de creatinina endógeno se ve afectado por la secreción tubular proximal activa (Darling y Morris., 1991).

La administración de creatinina exógena es segura, bien tolerada y no contribuye a la azotemia, pero no se debe realizar en pacientes urémicos (Watson y cols., 2002; Braun y cols., 2003). No existen productos comercializados con este propósito, pero se puede emplear creatinina sintética y elaborar la solución de forma estéril.

Para llevar a cabo esta prueba se han propuesto varios protocolos (Finco y cols., 2001; Watson y cols., 2002); pero, tanto administrada en infusión constante como en bolo, se correlaciona muy bien con el aclaramiento urinario de inulina (Finco y cols., 2001).

Aunque el aclaramiento extrarrenal de la creatinina puede disminuir falsamente la TFG, en el estudio de (Watson y cols., 2002) se comprobó que la ruta extrarrenal es insignificante ($< 1\%$). Respecto al número de muestras a tomar, los métodos en los que se toman más de cuatro muestras de sangre a lo largo de 10 horas, reducen el error asociado a la determinación del área bajo la curva a menos del 6% cuando se emplean modelos matemáticos no compartimentales (Watson y cols., 2002) (Tabla I).

A partir de la gráfica obtenida al representar las concentraciones plasmáticas del marcador a diferentes tiempos tras su administración, se calcula, mediante modelos matemáticos, el área bajo la curva (ABC) de ésta gráfica y el aclaramiento plasmático será el resultado de dividir la dosis del producto inyectado entre el ABC (Peters, 1991) (Esquema 7).



Esquema 7: Determinación del aclaramiento plasmático de creatinina exógena. Fuente: Braun y cols., 2003.

Esta prueba ofrece ciertas ventajas como por ejemplo que puede realizarse en la práctica clínica porque es un método fácil y sencillo. Solo es necesario extraer un pequeño volumen de sangre en cada determinación, no es necesario contar con un laboratorio externo ya que la determinación de la creatinina se puede llevar a cabo en la clínica y los resultados están disponibles inmediatamente. Como único inconveniente el paciente tiene que permanecer en ayunas las 24 h previas a la realización de la prueba y debe permanecer hospitalizado durante ese día ya que la última muestra de sangre ha de tomarse seis horas después de la inyección.

Tabla I: Número de muestras a tomar para la optimización del cálculo del área bajo la curva (ABC) de la concentración plasmática de creatinina vs tiempo, utilizando el modelo trapezoidal lineal (Watson y cols., 2002).

Nº de muestras	Tiempo entre muestras de sangre (minutos)											% de error máximo
	2	5	10	20	30	60	90	120	210	360	600	
2						*					*	-13,9
3					*			*			*	-8,7
4				*	*				*		*	6,3
5			*			*		*		*	*	-3,5
6		*			*	*			*	*	*	3,3
7		*	*			*		*	*	*	*	2,3
8		*	*			*	*	*	*	*	*	1,5
9	*		*		*	*	*	*	*	*	*	2,2
10	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	1,1
11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0

Otro de los principales inconvenientes de este procedimiento es que el rango de TFG varía entre los diferentes trabajos publicados (Tabla II).

Tabla II: Publicaciones en las que se ha medido la TFG a través del aclaramiento plasmático de creatinina exógena en el perro. (Willson, 2010).

Enfermedad	Número de perros	ml/kg/min M±DS	Referencia
Enfermedad cardíaca			
Enfermedad valvular crónica (NYHA clase I-II)	15	3,1(0,8)	Nicolle y cols., 2007
Enfermedad valvular crónica (NYHA clase III-IV)	9	1,7(0,7)	Nicolle y cols., 2007
Enfermedad valvular crónica no azotémica	16	3,2(0,6)	Nicolle y cols., 2007
Enfermedad valvular crónica, azotémica	8	1,4(0,5)	Nicolle y cols., 2007
Enfermedad infecciosa			
Leishmaniosis, ERC IRIS I, no proteinúrico	8	4,4(0,749)	Cortadellas y cols., 2008
Leishmaniosis, ERC IRIS I, proteinúrico	10	4,5(1,44)	Cortadellas y cols., 2008
Leishmaniosis, ERC IRIS II	5	2,8(0,97)	Cortadellas y cols., 2008
Leishmaniosis, ERC IRIS III	3	1,5(0,43)	Cortadellas y cols., 2008
Enfermedad endocrina			
Hipotiroidismo inducido	8	2,13(0,48)	Pancieria y Lefebvre 2009
Hipotiroidismo natural	14	1,6(0,4)	Gommeren y cols., 2009
1 mes postratamiento con tiroxina	14	2,1(0,4)	Gommeren y cols., 2009
6 meses postratamiento con tiroxina	11	2(0,4)	Gommeren y cols., 2009
Pasados 15 días de la administración de ketoprofeno	7	5,11(0,72)	Narita y cols., 2006

* NYHA= *New York Heart Association*; IRIS = *International Renal Interest Society*

2.b.- Otros marcadores:

Además de la inulina y la creatinina, se han empleado otras sustancias como marcadores para determinar la TFG, como contrastes con iohexol o gadolinio y radioisótopos.

El iohexol es un contraste iodado no iónico, muy estable en plasma, y se elimina intacto en orina durante un periodo de 74 min (Mutzel y Speck., 1980; Goy-Tollot y cols., 2006) realizaron la técnica tomando dos muestras, 5 y 12 min después de inyectar el marcador, permitiendo determinar la TFG con un margen de error aceptable. El análisis del marcador se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siendo los valores normales descritos para el perro de $2,9 \pm 0,3$ ml/kg/min (Laroute y cols., 1999) y 1,56-2,96 ml/kg/min (Moe y cols., 1995).

Entre los compuestos iodados iónicos empleados para determinar la TFG se encuentran el [^{125}I] iotalamato de sodio y el [^{131}I] iodohipurato de sodio.

Uno de los radioisótopos que se han empleado para monitorizar la TFG es el [Tc-99m-DTPA] Tc99m-ácido dietilenetriaminepentacético. El uso de estas sustancias requiere contar con instalaciones especiales y un periodo de aislamiento posterior a la prueba de 24h.

También se ha medido a través de la piel la eliminación renal de sinistrina marcada con fluoresceína (Steinbach y cols., 2014).

5.3.1.1.2.- Marcadores indirectos

5.3.1.1.2.1.-Urea

La urea se sintetiza en el hígado a través del ciclo de la ornitina a partir del amoníaco derivado del catabolismo de los aminoácidos. Estos aminoácidos proceden del catabolismo de las proteínas endógenas y exógenas.

Tiene un peso molecular de 60 Da y es filtrada en el glomérulo y reabsorbida en cantidad variable por los túbulos. En los túbulos colectores medulares la reabsorción de urea está ligada a la reabsorción de agua. De manera que en estados de descenso del volumen intravascular, bajo flujo tubular urinario y aumento de la hormona antidiurética, la reabsorción de urea es mayor (Israni y Kasiske., 2012). Por lo tanto, el aclaramiento de urea no nos permite estimar la TFG.

El incremento plasmático de urea se produce por múltiples factores tales como el sangrado digestivo, la administración de una dieta rica en proteínas o de ciertos fármacos. Por otro lado, su disminución plasmática puede estar asociada a insuficiencia hepática o shunt portosistémico (Israni y Kasiske, 2012).

5.3.1.1.2.2.-Creatinina

La creatinina es una molécula pequeña (113Da) que se origina de manera constante a través de la deshidratación de la creatina y de la defosforilación de la creatina fosfato. Su concentración plasmática depende fundamentalmente de la masa muscular, aumentando inmediatamente después de la ingesta y hasta 12 h después. Se elimina por filtración glomerular, es débilmente secretada por los túbulos renales y sufre escaso metabolismo extrarrenal. Entre los factores que pueden afectar a su concentración plasmática se encuentra la deshidratación (Braun, Lefevre, y Watson., 2003).

La escasa sensibilidad de la creatinina para la detección precoz de disfunción renal se debe a que la relación entre su concentración sérica y la TFG, en el perro y en el gato, es de tipo hiperbólico (Finco y cols., 1995). De manera que una gran reducción en una de las variables supone un cambio muy pequeño en la otra (Braun y cols., 2003).

Aunque la creatinina refleja los cambios en la TFG, en el estudio de Yabuqui y cols (2010) se correlaciona con el grado de glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial.

5.3.1.1.2.3.-Proteinuria

La proteinuria es perjudicial y contribuye a la progresión de la enfermedad renal. Las células tubulares proximales reabsorben las proteínas del filtrado glomerular, pero cuando éstas están presentes en cantidades excesivas, se pueden acumular en los lisosomas de las células tubulares causando la ruptura de los mismos y lesionando la célula. Además, las lesiones glomerulares

permiten la entrada de sustancias en los túbulos renales que pueden ser reabsorbidas y consecuentemente dañar las células tubulares (complemento, lipoproteínas, etc.).

En pacientes sanos es normal encontrar una pequeña cantidad de proteínas en la orina como resultado del paso de proteínas de bajo peso molecular a través del glomérulo y proteínas adicionadas en el túbulo renal (proteína de Tamm-Horsfall). Barsanti y Finco (1979) reportaron una cantidad normal de proteína en la orina de perros sanos ≤ 65 mg/dl.

Según su etiología, la proteinuria se clasifica como prerrenal, renal funcional, renal patológica (glomerular, tubular, intersticial) y postrenal (Lees y cols., 2005). Por otro lado, atendiendo a su peso molecular, en la orina se pueden encontrar proteínas de alto peso molecular (PAPM), como la proteína C reactiva o la IgG (150 kD), de peso molecular intermedio (PPMI), como la albúmina y de bajo peso molecular (PBPM) como la proteína transportadora de retinol (PTR) (21 kD). Otras proteínas que se han estudiado en la orina de los perros son γ -glutamyl transpeptidasa (GGT), N-acetyl- β -D-glucosaminidasa (NAG), α 1 microglobulina, B2 microglobulina, lisozima, proteína ligada a la vitamina D, transtiretina, tromboxano B2 (Biewenga y cols., 1986; Rayla y cols., 2003; Maddens y cols., 2010).

En presencia de lesión glomerular, la orina contiene PPMI, y en estadios muy avanzados presentarán PAPM (D'Amico y Bazi, 2003). Si la lesión es tubular, se detectan en la orina PBPM.

Por lo tanto, el tipo de proteínas presenten en la orina pueden ayudar de manera importante a localizar la lesión renal.

5.3.1.1.2.3.1.- Ratio proteína/creatinina en orina (UPC)

De manera objetiva, la cantidad de proteína que se elimina por orina se mide mediante la ratio proteína/creatinina en orina (UPC). Más específicamente, en medicina humana además se mide el grado de lesión glomerular mediante la ratio IgG/transferrina o albúmina; de manera que si la ratio es elevada, indica que hay PAPM pasando a través de la barrera de filtración, asociándose a mal pronóstico y ausencia de remisión de la lesión glomerular (D'Amico y Bazi., 2003).

El empeoramiento de la azotemia unido a una reducción de la proteinuria se considera un factor pronóstico negativo. Se sugiere que los valores de UPC en muestras seriadas tienen que diferir al menos en un 40% para considerar que la proteinuria en el perro ha aumentado o disminuido de forma significativa (Lees y cols., 2005). En un estudio reciente se investigó en qué pacientes es recomendable conocer la eliminación diaria de proteínas, a partir de los valores obtenidos de densidad y de proteínas en el urianálisis (Zatelli y cols., 2010). (Tabla III).

Tabla III: Resultados de la tira reactiva de urianálisis (Zatelli y cols., 2010): NP: no proteinúrico; UPC (d): realizar UPC con fines diagnósticos, UPC (g): realizar UPC para cuantificar la proteinuria.

USG	0+ (0mg/dl)	1+ (30mg/dl)	≥ 2+ (100 mg/dl)
≤ 1.012	NP	UPC (d)	UPC (g)
> 1.012 y < 1.030	NP	NP	UPC (g)
≥ 1.030	NP	NP	UPC (g)

En la orina de perros machos enteros no es inusual encontrar resultados positivos para proteínas en la tira reactiva de urianálisis asociado a la presencia de espermatozoides en el sedimento. Esto es debido al flujo retrógrado de eyaculado hacia la vejiga, que puede ocurrir independiente de la eyaculación. Prober y cols (2010) comprobaron en un estudio que la mezcla de muestras de orina sin proteínas con eyaculado completo y con fluido seminal libre de espermatozoides a una dilución 1:256 y 1:64, respectivamente, resultó con proteinuria detectable. Desafortunadamente, no existe ningún procedimiento que permita saber si una orina sin espermatozoides está contaminada con fluido seminal.

Con el fin de evitar la contaminación de la muestra con secreciones del tracto urinario inferior, hasta el momento, se venía recomendando determinar el UPC en muestras obtenidas por cistopunción. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las muestras de orina obtenidas por micción espontánea, con un sedimento urinario inactivo (ausencia de hematíes, glóbulos blancos y bacterias) son válidas para determinar el UPC y pueden ser clasificadas correctamente según la clasificación IRIS (Beatrice y cols., 2010).

Duffy y cols (2015) encontraron diferencias significativas en los UPC dependiendo del lugar físico en el que recoja la muestra. De manera que, para el mismo paciente, las orinas recogidas en el hospital tenían UPC más altos que las recogidas en casa. Esta diferencia fue más notable en orinas con UPC >0,5 y afectó fundamentalmente a la cantidad de proteína, pero no a la creatinina. Estos hallazgos pueden afectar tanto a la clasificación IRIS como a la decisión clínica de intervención farmacológica. Por ello se recomienda tomar siempre la muestra en la misma ubicación de cara a monitorizar la evolución del tratamiento.

La proteinuria puede variar de un día para otro. En el estudio de Nabity y cols (2007) realizado en pacientes con nefropatía hereditaria ligada al cromosoma X se encontraron, en muestras de orina tomadas mediante cistopunción en tres momentos consecutivos, una diferencia del 35% en las orinas con UPC cerca de 12 y del 80% en orinas con UPC <4. Por ello recomiendan tomar una única muestra en pacientes con UPC <4 y entre 2 y 5 muestras en pacientes con proteinurias mayores.

5.3.1.1.2.3.2.- Albúmina

La microalbuminuria puede estar producida por cualquier patología que desarrolle una proteinuria con albuminuria, por tanto, no es específica de enfermedad glomerular. Sin embargo en el perro se ha comprobado que la microalbuminuria (< 0.3 mg/dl) persistente precede a la proteinuria, al menos en ciertas nefropatías hereditarias (Lees y cols., 2002).

Estudios realizados en el perro y en el gato demuestran que la sensibilidad y especificidad de la microalbuminuria para detectar enfermedad sistémica, en comparación con el UPC y la albúmina/creatinina urinaria, son superiores. Por tanto, la valoración de la microalbuminuria junto a otras pruebas de cribado puede incrementar el diagnóstico de la enfermedad sistémica (Whittemore y cols., 2006; 2007).

5.3.1.2.- Marcadores nuevos de función glomerular

5.3.1.2.1.- Cistatina C.

La cistatina C es una proteína no glucosilada con un peso molecular de 13,3 kDa que es sintetizada de forma constante en todas las células nucleadas del organismo, se filtra libremente en el glomérulo y se reabsorbe en el túbulo proximal; por tanto, en ausencia de daño tubular su concentración en orina es muy baja (Fernández y cols., 2011).

Los estudios disponibles en medicina de animales de compañía, realizados exclusivamente en el perro, muestran resultados contradictorios sobre la utilidad de este parámetro.

No hay estudios publicados acerca de la sensibilidad diagnóstica de la cistatina C en la insuficiencia renal aguda en el perro, aunque en base a los hallazgos obtenidos en perros con una depleción experimental de volumen (Almy y cols., 2002) se ha sugerido que la cistatina C no es un indicador sensible de disminución de la TFG por causas que producen azotemia prerrenal o por fallo renal agudo. En este estudio se demostró que los niveles séricos de cistatina permanecen dentro del rango de referencia a pesar de que la TFG esté moderadamente disminuida por la hipovolemia. Sin embargo en su estudio sobre lesión renal aguda inducida tras la administración de gentamicina, Sasaki y cols (2014) demostraron que la cistatina urinaria, conjuntamente con la tasa de filtración glomerular, detectan mejor que otros biomarcadores los estados iniciales de lesión renal aguda.

Por otra parte, parece ser una buena prueba de cribado de enfermedad renal crónica (Antognini y cols., 2007; Wehner y cols., 2008a) pudiendo, además, ser útil para monitorizar los cambios secuenciales en la TFG en pacientes con fallo renal crónico (Antognini y cols., 2005). García Martínez y cols., 2015 han demostrado que la cistatina urinaria se encuentra significativamente aumentada en pacientes leishmaniósicos con proteinuria y azotemia.

A pesar de ello, y dada la mayor especificidad de la creatinina plasmática en el perro, se aconseja la determinación simultánea de ambos parámetros con el fin de aumentar la eficacia diagnóstica (Wehner y cols., 2008a).

5.3.1.2.2.- Dimetilarginina simétrica (SDMA)

La dimetilarginina simétrica es el producto de la metilación y posterior proteólisis de los residuos de arginina de las proteínas. Esta metilarginina se elimina por filtración glomerular, acumulándose en pacientes con fallo renal. La SDMA se correlaciona directamente con la TFG en perros (Navity., 2015). En otro estudio reciente en perros se ha demostrado que, a diferencia de la creatinina, la concentración sérica de SDMA no se correlaciona con la masa corporal magra y no se ve afectada por la edad, sexo o tipo de dieta; aunque, también a diferencia de la creatinina, se reduce en el tiempo posiblemente debido al efecto de la dieta sobre la funcionalidad renal. Por ello se especula que podría tener ventajas respecto a la creatinina en la monitorización de la respuesta clínica relacionada con el manejo dietético (Hall y cols., 2015).

5.3.2.- Marcadores de función tubular

5.3.2.1.- Marcadores clásicos de función tubular

5.3.2.1.1.- Densidad urinaria y osmolalidad urinaria

Una de las principales funciones del riñón es reabsorber una buena parte del agua filtrada a medida que el ultrafiltrado glomerular pasa por los túbulos renales. Por este motivo, la densidad de la orina que se excreta es superior a la del ultrafiltrado glomerular (Finco., 1995). Por otro lado la osmolalidad del ultrafiltrado glomerular es idéntica a la del plasma (James y Lunn., 2007).

La osmolalidad urinaria es una medida de la concentración de solutos en la orina mejor que la densidad urinaria. Cuando existe una proteinuria o una glucosuria marcada, la densidad urinaria refractométrica sobreestima la concentración de solutos y, por tanto, la capacidad de concentración renal. No obstante debido a la sencillez de su determinación en la clínica es más frecuente la determinación de la densidad urinaria.

La osmolalidad máxima de la orina de un perro puede llegar a ser de 2400 mOsm/kg y la de un gato de 3200 mOsm/kg (Braun y Lefebvre., 2008).

La determinación de la osmolalidad urinaria se limita generalmente a casos específicos en los que la valoración exacta de la capacidad de concentración o dilución del riñón es crítica.

La valoración de la densidad urinaria permite diagnosticar más precozmente la lesión renal que la creatinina plasmática, ya que la isostenuria ocurre cuando el 66% de las nefronas no son funcionales (Chew and cols., 2011).

5.3.2.2.- Marcadores nuevos de función tubular

5.3.2.2.1.- Excreción fraccionada de electrolitos

La mayoría de los iones, después de ser filtrados, se reabsorben en el túbulo proximal. Por lo tanto, su excreción urinaria se verá incrementada en caso de lesión tubular proximal. La valoración más exacta de la excreción urinaria de iones es la obtenida a partir de la orina recogida durante 24 horas, lo cual es impracticable en la mayoría de los casos en medicina veterinaria; por ello, generalmente se determina la excreción fraccionada (EF) a partir de una muestra de orina obtenida en cualquier momento y simultáneamente con una muestra de sangre. La EF de un ión refleja la tasa relativa de excreción del mismo, comparada con la de creatinina; por tanto, la EF depende de la concentración del ión en orina y en plasma, así como de la concentración urinaria y plasmática de creatinina.

La EF de iones está fuertemente influenciada por factores extrarrenales que intervienen en la concentración de iones en plasma, fundamentalmente la composición de la dieta (Waldrop., 2008).

Como regla general, la determinación de iones en orina puede ser útil a la hora de diferenciar las patologías prerrenales de las renales. Por ejemplo, en casos de máxima activación del eje RAA la concentración de la EFNa (excreción fraccionada de sodio) debería ser inferior al 1%; mientras que si el riñón es incapaz de responder a la hipovolemia, como en los casos de necrosis tubular aguda, la EFNa debería ser superior a 2-3% (Waldrop., 2008).

Una de las posibles utilidades del cálculo de la EF podría ser el diagnóstico del Síndrome de Fanconi. Sin embargo, no se considera necesario ya que la sola presencia de glucosuria sin hiperglucemia es altamente indicativa de esta tubulopatía funcional (Lefebvre y cols., 2008).

Brown y cols., 2015 han demostrado recientemente diferencias significativas en la reducción de la EFNa entre los pacientes que sobreviven y los que mueren debido a una lesión renal aguda. Además, estos cambios en la EFNa ocurren antes que la resolución de la azotemia.

5.3.2.2.2.- Enzimuria.

Las enzimas γ -glutamyl transpeptidasa (GGT) y N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) se localizan respectivamente en el ribete en cepillo y en los lisosomas de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales, y se excretan por la orina cuando dichas células se lesionan.

Se ha establecido el intervalo de referencia de los cocientes GGT/creatinina y NAG/creatinina en la orina de perros sanos (1,93 - 28,57 U/g y 0,02 - 3,63 U/g, respectivamente). El cociente NAG/creatinina urinario presenta diferencias significativas entre machos y hembras. Por otro

lado, el cociente GGT/creatinina difiere significativamente con los cambios en el pH ($< 7 \geq$) (Brunker y cols., 2009).

La principal indicación de la determinación de estas enzimas en orina es la detección precoz del fallo renal agudo por necrosis tubular, por ejemplo en pacientes que reciben antibióticos nefrotóxicos como la amikacina o gentamicina. El incremento de estas enzimas en orina precede a las alteraciones en los niveles de creatinina plasmática, densidad urinaria, UPC y cilindruria (Greco y cols., 1985; Grauer y cols., 1995; Rivers y cols., 1996). Estos autores observaron que los pacientes seropositivos a *Leishmania* eliminaban por orina cantidades significativamente superiores de GGT, NAG y B glucuronidasa, en relación a los paciente sanos. Además se observó una gran correlación entre las dos últimas.

5.3.2.2.3.- Proteínas de bajo peso molecular

5.3.2.2.3.1.-- Proteína transportadora de Retinol (PTR)

Se ha sugerido que la concentración urinaria de PTR puede ser un parámetro útil para detectar alteraciones mínimas en la funcionalidad de los túbulos, y que su elevación precede a la proteinuria significativa y a la azotemia (Bernard y cols., 1987). Sin embargo, la concentración urinaria de PTR no detecta la reducción del aclaramiento de creatinina exógena en pacientes con niveles plasmáticos de creatinina dentro del intervalo de referencia (Jens y cols., 2010).

5.3.2.2.3.2.- Lipocalina-gelatinasa neutrófila urinaria (NGAL)

NGAL es una proteína de 25 kDa covalentemente unida a la gelatinasa de los neutrófilos. Normalmente se elimina en baja concentración en la orina pero aumenta en la lesión epitelial tubular renal. Diversos estudios han puesto de manifiesto que el valor en orina de NGAL puede predecir la existencia de lesión renal aguda antes de que el valor de creatinina plasmática aumente fuera del rango de referencia (Segev y cols., 2013). Otros estudios concluyen que el NGAL en plasma podría servir para diferenciar la lesión renal aguda (LRA) de la ERC (Steinbach y cols., 2014) teniendo una mejor relevancia pronóstica en pacientes con ERC (Hsu and cols., 2014).

5.3.3.- Electroforesis de proteínas en orina

En algunas ocasiones puede ser interesante determinar el tipo de proteínas que se eliminan por la orina. De hecho, la electroforesis de proteínas en orina, en concreto la electroforesis en geles de poliacrilamida o SDS-PAGE, es considerada por IRIS como una técnica diagnóstica potencialmente útil en pacientes con proteinuria renal (Littman y cols., 2013). Debido a la buena correlación entre los patrones electroforéticos y la lesión histológica, la electroforesis de proteínas en orina permite localizar la lesión renal de manera poco invasiva (Schultze y Jensen., 1989). Sin embargo, Zini y cols (2004) afirmaron que aunque es una técnica muy sensible para

identificar la lesión glomerular y tubulointersticial, en los perros tiene una especificidad relativamente baja. Por otro lado Navity y cols (2010b) consideraron la especificidad de moderada a alta comparada con la biopsia renal, cuando se utilizó orina normalizada con respecto a la densidad y la concentración de proteínas.

En el perro se han empleado varias técnicas de separación en el estudio de diferentes patologías, como SDS-AGE o acrilamida (Zini y cols., 2004), SDS-PAGE (Schultze y Jensen., 1989; Buono y cols., 2012; Beristain-Ruiz y cols., 2013; Cavalcante y cols., 2013) y Western blot (Zaragoza y cols., 2003; 2004), electroforesis de alta definición (Giori y cols., 2011), electroforesis en dos dimensiones (Navity y cols., 2011) con espectrofotometría de masas (Hormaeche y cols., 2014).

La técnica de SDS-PAGE se ha utilizado para separar las proteínas según su peso molecular y de esta manera identificar diferentes patrones electroforéticos. Así, en presencia de una lesión tubular encontraremos PBPM ($PM < 60$ KDa) y en caso de lesión glomerular encontraremos PPMI o PAPM ($PM \geq 60$ KDa) (Schultze y Jensen, 1989) aunque los puntos de corte difieren en la bibliografía consultada (Bazzi y cols., 1997; Altintas y cols., 2000; Yalçın y cols., 2004). Este patrón glomerular puede ser selectivo, con el paso de PPMI (predominantemente albúmina) o no selectivo (PPMI y PAPM). Normalmente, encontraremos lesión glomerular y tubular combinada dando lugar a un patrón mixto de proteinuria (Bazzi y cols., 1997).

Aparte del estudio cualitativo, se ha utilizado la densitometría para medir la cantidad de proteínas presentes en cada región (Cavalcante y cols., 2013).

La técnica de SDS-PAGE también se ha empleado para evaluar la evolución en el tiempo de los patrones electroforéticos en el transcurso de diferentes patologías y su respuesta al tratamiento como por ejemplo Bazzi y cols (1997); durante el tratamiento con trilostano en perros con hiperadrenocorticismismo (Caragelasco y cols., 2013); para investigar una posible lesión tubular en pacientes con diabetes mellitus (Martorelli y cols., 2013); en pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 2 y 3 (Waki y cols., 2013) y para detectar la lesión renal inicial en pacientes con leishmaniosis (Buonol y cols., 2012).

5.4.- ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La ERC es una de las patologías más frecuentes en pequeños animales. De etiología heterogénea, se han descrito multitud de desórdenes que inducen cambios patológicos en los glomérulos, túbulos, vasos o intersticio que finalmente reducen el número de nefronas funcionales (Yabuqui y cols., 2010). El fallo renal crónico ocurre cuando los mecanismos de compensación renal no son capaces de mantener las funciones propias del riñón: regulación de electrolitos, del equilibrio hídrico y ácido base y síntesis de hormonas (Chew y cols., 2011).

Aunque la ERC se caracteriza por la presencia de una anomalía estructural o funcional en uno o ambos riñones durante un periodo prolongado de tiempo, normalmente tres meses o más, puede ocurrir que un evento determinado desencadene una lesión renal aguda en un paciente con ERC, lo que se conoce como lesión renal crónica reagudizada (Polzin y cols., 2011).

El objetivo diagnóstico y terapéutico en la enfermedad renal será frenar su evolución y consecuencias (Lefebvre y cols., 2004) así como mejorar la calidad de vida del paciente.

La incidencia de ERC en pacientes con leishmaniosis, en base a los criterios de la clasificación IRIS, se ha descrito en el 49,5% (Cortadellas y cols., 2006).

IRIS clasifica a los enfermos renales crónicos en base a sus niveles de creatinina plasmática en cuatro niveles, que a su vez se pueden subclasificar en función de la proteinuria y de la presión arterial. Este tipo de clasificación permite unificar criterios para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estos pacientes (Tablas IV, V, VI y VII).

Tabla IV: Clasificación IRIS según los niveles plasmáticos de creatinina (mg/dl)

Estadio	Perro	Aclaraciones
En riesgo	< 1,4	El perro presenta riesgo de desarrollar en el futuro enfermedad renal crónica (ERC) debido a factores como la edad o la presencia de enfermedades infecciosas en la zona en la que vive.
Estadio I	< 1,4	No azotémico pero presenta alteraciones como incapacidad para concentrar la orina, proteinuria renal, biopsia renal anormal, aumento de la creatinina en muestras seriadas.
Estadio II	1,4-2	Azotemia media. Valor en el límite superior de la normalidad. Debido a la insensibilidad de la creatinina como método diagnóstico, puede ocurrir que estos perros tengan problemas en la excreción de sustancias.
Estadio III	2,1-5	Azotemia moderada
Estadio IV	>5	Riesgo de crisis urémica.

Recientemente IRIS ha incluido la clasificación en base al SDMA, aunque estos datos son preliminares. De esta manera un aumento progresivo de este marcador por encima de 14 µg/dl sugiere una reducción de la función renal y puede ser la razón para considerar a un perro o un gato con valores de creatinina inferior a 1,4 o 1,6 mg/dl, respectivamente, como IRIS ERC I.

En estadio IRIS II, un paciente con baja condición corporal y un valor de SDMA superior o igual a 25 µg/dl puede indicar que el grado de disfunción renal ha sido subestimado y se debería considerar aplicar el tratamiento correspondiente al estadio IRIS ERC III.

En estadio IRIS III, un paciente con baja condición corporal y un valor de SDMA superior o igual a 45 µg/dl puede indicar que el grado de disfunción renal ha sido subestimado y se debería considerar aplicar el tratamiento correspondiente al estadio IRIS ERC IV

Tabla IV: Clasificación IRIS de la proteinuria según el UPC.

Perro	UPC
Proteinúrico	>0,5
<i>Border line</i>	0,2-0,5
No proteinúrico	<0,2

Además de la clasificación en base a la ratio proteína/creatina en orina, el consenso del *American Veterinary College of Internal Medicine* (ACVIM) (Littman., 2013) estableció unos niveles recomendados para clasificar a los pacientes con enfermedad glomerular.

Tabla VI: Descripción de los niveles recomendados para agrupar perros con enfermedad glomerular (Littman y cols., 2013).

Nivel II: Proteinuria renal persistente sin hipoalbuminemia ni azotemia

Nivel I-A: Proteinuria renal subclínica persistente no acompañada de signos clínicos o secuelas renales.

Nivel I-B: Proteinuria renal persistente con hipertensión como único signo o secuela renal, con o sin evidencia de lesión en órganos diana.

Nivel II: Proteinuria renal con hipoalbuminemia y sin azotemia

Nivel II-A: Proteinuria renal persistente con hipoalbuminemia, con o sin complicaciones asociadas o secuelas (edema o tromboembolismo) sin hipertensión o azotemia.

Nivel II-B: Proteinuria renal persistente con hipoalbuminemia, con o sin complicaciones asociadas o secuelas (edema o tromboembolismo) con hipertensión (con o sin evidencia de lesión en órganos diana), sin azotemia.

Nivel III: Proteinuria renal con azotemia

Nivel III-A: Proteinuria renal con azotemia, sin hipertensión ni hipoalbuminemia.

Nivel III-B: Proteinuria renal con azotemia e hipertensión (con o sin evidencia de lesión en órganos diana), sin hipoalbuminemia.

Nivel III-C: Proteinuria renal con azotemia e hipoalbuminemia con o sin secuelas asociadas (edema y tromboembolismo), que a menudo (pero no siempre) se acompaña de hipertensión (con o sin evidencia de lesión en órganos diana).

Tabla VII: Clasificación IRIS según la presión arterial

Perro	Presión sistólica	Presión diastólica
Normotenso	< 150 mmHg	< 95 mmHg
Hipertensión en el límite	150-159 mmHg	95-99 mmHg
Hipertenso	160-179 mmHg	100-119 mmHg
Hipertenso grave	≥ 180 mmHg	≥ 120 mmHg

5.4.1.-Tratamiento nutricional

Una buena condición corporal en el momento del diagnóstico de la enfermedad renal crónica se asocia con una mejor esperanza de vida (Parker y Freeman, 2011).

La administración de una dieta renal junto con benazeprilo, a pacientes proteinúricos y no azotémicos, puede ser de ayuda en el control de la proteinuria y de la presión arterial comparado con pacientes que reciben una dieta de mantenimiento (Cortadellas y cols., 2014). Además, la administración de una dieta renal previene o retrasa la aparición de la uremia y la muerte prematura como consecuencia de las complicaciones asociadas a la ERC (Jacob y cols., 2002).

Las dietas renales contienen niveles reducidos de proteínas, fósforo y sodio, aumento de vitamina B y fibra soluble y de la densidad calórica, tienen un efecto neutro sobre el equilibrio ácido-base, contienen suplemento de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y antioxidantes. Por todo ello, en pacientes con ERC, no se considera adecuado sustituir una dieta renal por una *senior* o de mantenimiento (Polzin y cols., 2011).

Además diversos estudios han demostrado un efecto aditivo e independiente resultando en la ralentización del descenso de la TFG, cuando se adicionan a la dieta antioxidantes y ácidos grasos poliinsaturados omega -3, con el objetivo de conseguir una ratio omega -6/ omega -3 de aproximadamente 5:1. Los antioxidantes reducen la magnitud de la proteinuria, la glomeruloesclerosis y la fibrosis intersticial, independientemente a los ácidos grasos poliinsaturados (Brown., 2008).

La mayor preocupación relacionada con la ingesta de dietas bajas en proteínas es la malnutrición proteica e hipoalbuminemia, especialmente en pacientes con proteinuria intensa. Se sabe que los perros necesitan que el 4-5% de las calorías ingeridas al día provengan de las proteínas. Actualmente no está del todo claro el momento exacto en el que se debe comenzar la restricción y por ello se cuestiona el uso de estas dietas en pacientes en fase IRIS 1 de ERC. Como norma general se recomienda realizar el cambio dietético en el momento en que existan evidencias de evolución de la enfermedad (ej. orina cada vez menos concentrada, proteinuria etc.) incluso si en ese momento el paciente no tiene azotemia (Chew y cols., 2011).

La respuesta nutricional durante el tratamiento se valorará en función del peso corporal, condición corporal (el objetivo será mantener un índice corporal de 5 sobre 9), nivel de ingesta de calorías, albúmina sérica, hematocrito y calidad de vida (Polzin y cols., 2011).

Si el paciente no consume una cantidad adecuada de alimento se puede plantear la colocación de un tubo de esofagostomía o de gastrostomía que por otro lado facilitará la administración de los medicamentos.

5.4.2.- Signos digestivos asociados a la uremia

Otro factor importante a considerar en el manejo de pacientes con ERC es la presencia de gastritis urémica. Se ha demostrado que los niveles de gastrina están anormalmente elevados, y que el grado de hipergastrinemia está correlacionado con la gravedad de la enfermedad renal. Sus manifestaciones clínicas potenciales son anorexia, vómitos y sangrado gastrointestinal. Todos ellos contribuyen a deteriorar la calidad de vida y la condición física, y son parte importante de la pérdida de peso y anemia que acompaña a la enfermedad en los estadios más avanzados.

Las complicaciones gastrointestinales más frecuentes en pacientes en estadios III y IV son reducción del apetito, náuseas, vómitos, estomatitis urémica y halitosis, hemorragia digestiva, diarrea y colitis hemorrágica.

El tratamiento irá encaminado a reducir el pH gástrico ácido mediante bloqueantes H₂, inhibidores de la bomba de protones o citoprotectores, además de suprimir las náuseas y los vómitos mediante antieméticos.

5.4.3.- Estado de hidratación

La deshidratación es una complicación común en los pacientes con ERC y puede exacerbar las náuseas, anorexia y el estreñimiento. Por otro lado la pérdida de fluidos por vómitos o diarreas puede contribuir a la azotemia prerrenal y por lo tanto a la reagudización de la ERC (Polzin y cols., 2011).

Debido al riesgo de deshidratación, es muy importante permitir el acceso libre al agua en los pacientes que padecen poliuria/polidipsia (Chew y cols., 2011) y considerar la administración de fluidoterapia subcutánea en pacientes con deshidratación crónica (Polzin y cols., 2011).

5.4.4.- Acidosis metabólica

Cuando el tratamiento dietético no es suficiente para corregir el equilibrio ácido-base, se recomienda añadir citrato potásico o bicarbonato sódico y realizar una gasometría sanguínea a los 10-14 días para evaluar la respuesta al tratamiento y ajustar la dosis (Polzin y cols., 2011).

5.4.5.- Anemia

La anemia en la ERC es de tipo no regenerativa y se origina como consecuencia de la insuficiente producción de eritropoyetina por el riñón y como consecuencia reducción de la eritropoyesis; aunque también contribuyen otros factores como deficiencia de hierro debido a pérdida crónica digestiva de sangre, inflamación crónica, malnutrición, fibrosis medular asociada al hiperparatiroidismo, reducción de la vida media de los eritrocitos debido a las toxinas urémicas y estrés oxidativo.

Kogica y cols (2015) no pudieron demostrar la relación entre el estrés oxidativo y el empeoramiento de la anemia en pacientes con enfermedad renal crónica. Aunque existe evidencia de que estos pacientes presentan un aumento del estrés oxidativo sistémico, la respuesta compensadora de la superoxidodismutasa y la concentración eritrocitaria mantenida de glutatión, indican que los pacientes con ERC y anemia mantienen su defensa antioxidante.

Hasta el momento, las opciones terapéuticas disponibles para corregir la anemia de ERC consisten en la administración de eritropoyetina (con transfusiones sanguíneas si son necesarias) y protectores gástricos, siendo controvertida la terapia con esteroides anabolizantes (Kralova y cols., 2010; Polzin y cols., 2011).

Un estudio reciente llevado a cabo en ratas con enfermedad poliquística renal ha demostrado que los niveles de EPO permanecen aumentados en todos los estados de ERC y no se correlacionan con la anemia, con la urea ni con la creatinina. Sin embargo, el hecho de que existan niveles aumentados de EPO en presencia de anemia no regenerativa, junto a la existencia de una correlación negativa entre la hemoglobina y el hematocrito con la urea y a la ausencia de proliferación eritroide; lleva a los autores a concluir que la anemia se pueda deber a una deficiente respuesta eritroide a la EPO inducida por la uremia (Phillips y cols., 2015). Este nuevo hallazgo podría cambiar en el futuro el abordaje de la anemia en la enfermedad renal crónica.

Las eritropoyetinas más frecuentemente usadas en perros y en gatos son la recombinante humana o Epogen (rhEPO) y la darbepoyetin alfa (DPO).

Los pacientes tratados con EPO tienen un riesgo del 20-50% de desarrollar anticuerpos antieritropoyetina exógena. Una vez iniciado el tratamiento, los anticuerpos tardan entre 30 y 90 días en formarse. En algunos casos incluso se pueden formar anticuerpos frente a la propia eritropoyetina endógena. En este último caso los pacientes desarrollarán anemias muy graves y necesitarán transfusiones repetidas hasta que se eliminen todos los anticuerpos (tiempo estimado 6 meses). Otros posibles efectos adversos asociados a la administración de EPO son hipertensión, vómitos, convulsiones, uveítis e hipersensibilidad mucocutánea (Chew y cols., 2011).

La DPO es una eritropoyetina de acción prolongada (tres veces más que la EPO) y está asociada a menor producción de anticuerpos antieritropoyetina. 1µg de DPO se corresponde con 200 U de EPO, aunque la experiencia con esta terapia es aún bastante limitada.

Aunque por el momento la eritropoyetina recombinante canina rcEPO no está comercializada, se ha descrito que estimula la producción de eritrocitos en pacientes con ERC sin producir aplasia eritroide, incrementa el apetito y la actividad física, pero sin embargo, no restaura la producción de eritrocitos en pacientes que sufren aplasia eritroide inducida por la administración de rhEPO (Raldolph y cols., 2004).

Se recomienda la suplementación con hierro al inicio del tratamiento en todos los pacientes que reciban tratamiento con eritropoyetina (Polzin y cols., 2011).

5.4.6.- Proteinuria

Cortadellas y cols, en 2006 describieron una incidencia de proteinuria (UPC>1) del 41% en 34/82 en pacientes con Lcan.

Estudios de hemodinamia glomerular demuestran que la administración de IECAs, produce un incremento del coeficiente de ultrafiltración, dan lugar a una reducción significativa de la proteinuria, reducen la presión sistémica e intraglomerular y modulan la progresión estructural de la enfermedad renal (Brown y cols 2001; Brown y cols., 2003) Por ello se recomienda el uso de los IECAs en pacientes con ERC, especialmente si presentan proteinuria (Lefebvre y cols., 2004).

Los IECAs están contraindicados en estados de hipotensión, hipovolemia, hiponatremia o fallo renal agudo. En estas circunstancias la angiotensina II mantiene la TFG mediante la vasoconstricción de la arteria eferente renal. En pacientes que presenten dichas complicaciones se puede suspender temporalmente la administración de los IECAs hasta que se solucione la causa que ha precipitado la situación de hipovolemia.

Una semana después de iniciar el tratamiento se debe chequear la función renal para comprobar que no ha habido un descenso muy brusco de la TFG. Se considera normal encontrar incrementos del 20-30% de creatinina respecto al nivel basal; si el incremento es mayor se recomienda reducir la dosis.

El consenso del colegio americano de medicina interna recomienda comenzar el tratamiento estándar de enfermedad glomerular (Brown y cols., 2013) tan pronto como sea posible, en paciente con serología positiva a un agente infeccioso y $UPC \geq 0,5$. Este tratamiento se debe administrar conjuntamente con el tratamiento de la enfermedad infecciosa (Goldstein y cols., 2013).

Los antagonistas de los receptores de angiotensina o ARA II se han empezado a utilizar recientemente en medicina veterinaria como alternativa en los pacientes que pueden presentar un bloqueo incompleto del eje RAA. Bugbee y cols (2014) describieron la resolución de la proteinuria refractaria a la administración de benaceprilo 1 mg/kg/12h VO, con Telmisartan a razón de 1 mg/kg/día VO.

5.4.7.- Hipertensión arterial (HA)

El control de la presión arterial (PA) es posible debido a una mezcla de factores neuro hormonales dependientes del corazón, cerebro, vasos y especialmente los riñones.

La HA puede tener un origen idiopático pero lo más frecuente es que sea secundaria a una enfermedad sistémica.

La HA debida a ERC es consecuencia de la activación del eje RAA, de la secreción paracrina de angiotensina II, del exceso de tono simpático, del hiperparatiroidismo crónico e incluso de la administración de eritropoyetina (Syme., 2011).

La prevalencia de hipertensión arterial en perros con ERC de origen desconocido es muy distinta entre los trabajos publicados y posiblemente sea fruto de los diferentes métodos de medida empleados, diferentes valores de referencia e incluso del estadio de la enfermedad (Ross., 1992).

En medicina humana, la hipertensión es más frecuente en pacientes con enfermedad glomerular que tubulointersticial (Buckalew y cols., 1996). Tozzi Braga y cols (2015) demostraron en un estudio realizado en perros con Lcan una correlación positiva entre la PAS y el UPC en ausencia de correlación entre la gravedad histológica de la lesión glomerular y la PAS.

Cook y cols (1996) en un estudio en el que sólo se tuvieron en cuenta perros con glomerulopatías, describieron una incidencia de HA del 55,8%. Cortadellas y cols (2006) describieron una prevalencia del 61,5% en pacientes con Lcan y enfermedad renal, siendo la hipertrofia del ventrículo izquierdo la consecuencia más frecuente de la hipertensión sistémica. El mismo estudio además describe que el 70,6% de los pacientes en estadios iniciales de enfermedad renal, proteinúricos ($UPC \geq 0,5$) y no azotémicos, presentaron presiones sistólicas ≥ 150 mmHg.

Todo ello resalta la importancia de la monitorización de este parámetro en pacientes con glomerulopatías.

La HA en pacientes con ERC puede producir deterioro de la función renal no sólo porque cause anomalías en la morfología y funcionalidad renal sino porque puede dar lugar a un aumento de la presión capilar intraglomerular (Finco., 2004).

Se sabe que los pacientes con ERC y HA tienen más riesgo de sufrir una crisis urémica y muerte (Jacob y cols., 2003; Finco., 2004). Sin embargo, en ocasiones la HA es un reto diagnóstico. Tanto la hipertensión de “bata blanca” como la inexactitud y poca precisión de los métodos convencionales no invasivos en perros y gatos, hace que a veces sea muy complicado saber cuál es la presión arterial de un paciente. Por ello, en ocasiones, hay que basarse en las lesiones que la hipertensión mantenida produce en ciertos órganos diana como los ojos (ej. ceguera súbita, hemorragia vítrea, hipema); en el cerebro, corazón y vasos (ej. hipertrofia del ventrículo izquierdo, arritmias, soplo sistólico, ritmo de galope, etc.).

La decisión de tratar o no a un paciente hipertenso dependerá del riesgo asociado según el grado de hipertensión, de la existencia de lesiones en órganos diana y de la existencia de otra patología que pueda contribuir al aumento de la presión.

El consenso del ACVIM sobre hipertensión publicado en 2007 (Brown y cols., 2007) proporciona las pautas a seguir en el diagnóstico, tratamiento y monitorización de los pacientes con HA.

Generalmente, en los perros se recomienda empezar el tratamiento administrando un IECA como benazeprilo o enalapril a razón de 0,5 mg/kg/12-24h VO. Sin embargo, en muchas ocasiones estos pacientes necesitan combinar un IECA con otros fármacos como bloqueantes de los canales del calcio o Beta-Bloqueantes, ya que los IECA aplicados en monoterapia son fármacos poco eficaces en el control de la presión arterial en pacientes hipertensos con ERC (Lefebvre y cols., 2004).

5.4.8.- Hiperparatiroidismo secundario

El diagnóstico, tratamiento y prevención del hiperparatiroidismo secundario renal es muy importante ya que el exceso de PTH puede complicar el tratamiento y contribuir a la progresión de la enfermedad renal.

La homeostasis del calcio está regulada por el fósforo y por tres hormonas (PTH, calcitriol y calcitonina).

Los pacientes que tienen ERC sufren una pérdida progresiva de nefronas y un descenso de la TFG. Esto da lugar al incremento de los niveles plasmáticos de las sustancias que son normalmente eliminadas vía renal, como por ejemplo el fósforo. El incremento de fósforo producirá un estímulo crónico de las glándulas paratiroides con el fin de aumentar los niveles de calcio, dando lugar a una hiperplasia paratiroidea. En los pacientes caninos con Lcan la concentración de fósforo sérico se correlaciona con la gravedad de la lesión renal (Cortadellas y cols., 2009).

La lesión de los túbulos renales proximales dará lugar a un déficit en la síntesis de calcitriol y como consecuencia, a una reducción del calcio ionizado (iCa) extracelular, debido a su falta de reabsorción intestinal, mediada por calcitriol. El calcitriol también actúa directamente sobre las glándulas paratiroides regulando la secreción de PTH, por lo tanto el descenso de calcitriol conlleva a una pérdida del mecanismo *feedback* y al incremento de PTH.

A medida que la enfermedad renal progresa se pueden encontrar niveles de iCa normales o bajos. Sin embargo, se puede desarrollar una hipercalcemia ionizada como consecuencia de la propia ERC y puede contribuir a la azotemia mediante la mineralización de los túbulos renales (nefrocalcinosis), descendiendo la TFG, alterando el flujo sanguíneo renal y empeorando la capacidad de concentración.

La hiperfosfatemia y el descenso de absorción de calcio en el intestino lleva a un aumento crónico de la producción de PTH. Como consecuencia de la movilización de calcio, producto del incremento de la actividad osteoclástica para mantener normales los niveles de Ca y P, se produce una osteodistrofia fibrosa, supresión de médula ósea, mineralización de tejidos blandos, urolitiasis y neuropatía (Schenck y cols., 2006). Los huesos más sensibles a sufrir este proceso son el hueso dental alveolar, maxilar y mandíbula.

El producto Ca x P es un factor pronóstico negativo más fiable que la concentración de iCa ó P (Lippi y cols., 2014). Cuando el producto Ca x P es superior a 60-70 mg/dl se produce la mineralización de tejidos blandos. La calcificación renal contribuirá al empeoramiento de la enfermedad renal.

La determinación del iCa permitirá diferenciar el hiperparatiroidismo primario del secundario. Hay que tener en cuenta que un pH sanguíneo ácido disminuirá la unión del Ca a las proteínas aumentando los niveles plasmáticos del iCa.

La determinación de los niveles de calcitriol se puede usar para diferenciar hiperparatiroidismo primario del secundario; debido al déficit de síntesis renal, en el hiperparatiroidismo secundario se encontrará disminuido.

El control de los niveles de fósforo se consigue mediante la administración de una dieta adecuada y el tratamiento quelante. Los estudios realizados en medicina veterinaria demuestran que la administración de una dieta con niveles controlados de fósforo no sólo reduce los niveles de fósforo y PTH sino que prolonga la esperanza de vida ralentizando la evolución de la enfermedad renal (Finco y cols., 1992; Jacob y cols., 2002). Aproximadamente, cuatro a seis semanas después de iniciar el tratamiento dietético se deben valorar los niveles plasmáticos de fósforo. Dicha determinación debe realizarse después de un periodo de ayuno de 12 h. Si no se han alcanzado los objetivos terapéuticos según el estadio IRIS, se debe comenzar la

administración de una sustancia quelante que, tradicionalmente, contiene sales de aluminio o de calcio (Polzin y cols., 2011).

En medicina humana, el tratamiento a largo plazo con quelantes del fósforo basados en sales de aluminio está asociado a niveles séricos elevados del mismo y su acumulación en diferentes tejidos incluyendo el cerebro (Alfrey y cols., 1980). El hecho de que las dosis convencionales de estos productos a veces sean insuficientes para controlar los niveles de fósforo, unido a su vía de eliminación renal, predispone a estos pacientes a sufrir sobredosificación. En pacientes caninos la sobredosificación se manifiesta con signos neurológicos (Segev y cols., 2008). Los principales efectos secundarios descritos en medicina humana son anemia macrocítica, encefalopatía y osteomalacia (Alfrey y cols., 1976; Yuan y cols., 1989).

La administración conjunta de quelantes que contengan calcio y calcitriol puede dar lugar al desarrollo de hipercalcemia (Chew y cols., 2011).

Estudios en medicina humana han demostrado que en pacientes con ERC hay una reducción de la expresión de los receptores del calcio y como consecuencia la glándula paratiroides es menos eficaz a la hora de detectar los niveles plasmáticos de calcio, aumentando la secreción de PTH. Basados en estos estudios, los calcimiméticos (ej. cinacalcet) cambian la configuración espacial de los receptores del calcio, y como resultado cambian la sensibilidad al mismo atenuando la hiperplasia de la glándula paratiroides (Cannata-Andía y cols., 2010). En medicina veterinaria, por el momento, no existen estudios que avalen la eficacia de estos productos (Chew y cols., 2011).

El lantharenol (carbonato de lantano octahidrato) es un quelante no basado ni en aluminio ni en calcio. Tiene una capacidad de unir el fósforo muy semejante a la del aluminio pero está asociado a menores efectos adversos sistémicos y se elimina por vía hepática. En humanos induce menos hipercalcemia que el carbonato cálcico (Hutchison y cols., 2005). En medicina veterinaria su formulación permite la administración a perros pequeños y gatos.

El calcitriol sólo se debe administrar cuando se hayan controlado los niveles de fósforo.

Si el producto $\text{Ca} \times \text{P}$ es mayor de 60-70 mg/dl se debe disminuir o suprimir la administración de calcitriol debido al riesgo de mineralización de tejidos blandos. El calcitriol se puede administrar diariamente, intermitentemente o en pulsos (Chew y cols., 2011).

5.4.9.- Linfopenia

Los pacientes con ERC sufren con frecuencia linfopenia, más pronunciada a medida que los signos clínicos son más graves. La detección de linfopenia en pacientes con ERC debe alertar de una alteración en la respuesta inmune y de la elevada probabilidad de sufrir infecciones secundarias (Kralova y cols., 2010).

Se desconoce cuál es el mecanismo exacto que da lugar a la alteración del sistema inmune de estos pacientes. Se postula que las consecuencias metabólicas y tóxicas de la ERC unido a la malnutrición, al déficit de vitaminas y a la administración de fármacos pueden contribuir a la inmunodepresión. Por otro lado, en pacientes humanos urémicos se ha demostrado que los linfocitos en sangre periférica sufren una apoptosis acelerada cuando se cultivan *in vitro* (Matsumoto y cols., 1995).

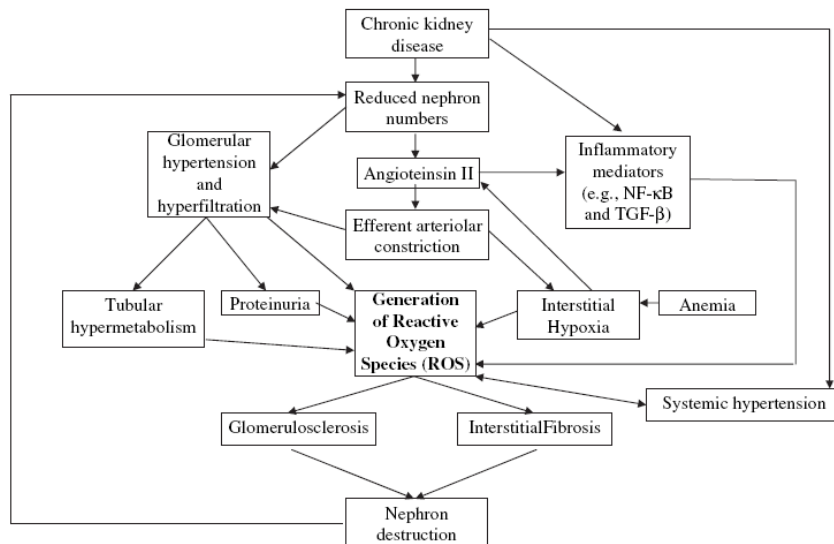
Por todo ello, es recomendable realizar un cultivo de orina como parte de la base de datos mínima en pacientes con ERC, aun cuando no exista, signos de inflamación en el sedimento urinario (Mayer-Roenne y cols., 2007).

5.4.10.- Inflamación en la ERC

En el riñón, las células glomerulares, tubulares y los macrófagos activados son generadores importantes de especies reactivas al oxígeno (*Reactive oxygen species*, ROS). En concreto, las mitocondrias son las fuentes más importantes de ROS y los generan durante la respiración oxidativa. Por lo tanto, en condiciones normales, en el riñón siempre se generan pequeñas cantidades de ROS y la lesión que producen está siempre en constante reparación. El estrés oxidativo renal se define como el daño tisular resultado de la acumulación de ROS atribuible a una alteración del balance entre su generación y la capacidad antioxidante renal. La ERC se asocia con una deficiencia relativa antioxidante y por otro lado estos pacientes presentan problemas concurrentes que aumentan el grado de generación de ROS como edad avanzada, activación del eje RAA e inflamación crónica renal y sistémica. La proteinuria, además, induce la liberación de citoquinas proinflamatorias en las células tubulares proximales, que conducirán a la generación de más ROS (Agarwal., 2003) (Esquema 8).

En humanos la ERC está asociada con la activación de la respuesta inflamatoria (Stenvinkel., 2002). En pequeños animales con ERC se especula que el estrés oxidativo contribuye a la fibrosis intersticial renal, glomeruloesclerosis, hipertensión glomerular y sistémica, inflamación sistémica y renal y descenso progresivo de la función renal (Brown., 2008).

En relación al estrés oxidativo, se postula que el tratamiento de la ERC con sustancias bloqueantes de la enzima de conversión de la angiotensina, antagonistas de los canales del calcio y ácidos grasos poliinsaturados omega-3 reduzcan la formación de especies reactivas al oxígeno (Brown., 2007).



Esquema 8: Generación de ROS en la ERC. Fuente: Brown y cols., 2008.

En estudios recientes de medicina basada en la evidencia se ha establecido que de todas las recomendaciones terapéuticas citadas anteriormente, en el perro sólo existe evidencia médica grado 1 para la administración de dieta renal en estadios III y IV de ERC y de la terapia con calcitriol (Roudebush y cols., 2010). Esto no quiere decir que los tratamientos con menor grado de evidencia no deban ser recomendados, sino que se deberían priorizar los tratamientos con mayor grado de evidencia según los recursos y las circunstancias del propietario (King y cols., 2007). En cualquier caso, es muy difícil establecer de forma objetiva la eficacia de las diferentes terapias dado el riesgo que implica para paciente la realización de estudios doble ciego en el tratamiento de determinadas alteraciones derivadas de la lesión renal y que según los expertos pueden resultar fatales en el transcurso de la enfermedad (ej. la hipertensión arterial) (Tabla VIII).

Tabla VIII: Grados de evidencia que apoyan las recomendaciones terapéuticas en pacientes con ERC

Grado 1: Resultados obtenidos a través de uno o más ensayos clínicos correctamente diseñados, aleatorios y controlados, realizados en pacientes clínicos de las especies objetivo.

Perro

- Dieta renal (Estadíos III y IV)
 - Terapia con calcitriol (hiperparatiroidismo en perros con ERC)
-

Grado 2: Evidencia obtenida a través de estudios adecuadamente diseñados, aleatorios y controlados, realizados utilizando animales de la especie objetivo con enfermedad espontánea en un laboratorio o un centro de investigación.

Perro

- IECA (pacientes con proteinuria y ERC)
 - Dieta renal (pacientes con proteinuria y ERC)
-

Grado 3: Evidencia obtenida a través de estudios adecuadamente controlados sin asignación al azar, debidamente diseñados de cohortes o estudios caso-control, estudios utilizando modelos aceptables de la enfermedad o simulaciones en las especies objetivo; resultados de estudios no controlados o series de casos.

Perro

- rhEPO (pacientes con anemia y ERC)
 - Restricción de fósforo en la dieta (Estadíos III y IV ERC)
 - Suplementación con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (Estadíos III y IV ERC)
 - Suplementación con antioxidantes (Estadíos II y III ERC)
-

Grado 4: Evidencia obtenida a través de estudios realizados en otras especies, informes de comités de expertos, estudios descriptivos, informes de casos, justificaciones patofisiológicas y opiniones de expertos desarrolladas sobre la base de sus experiencias clínicas.

Perro

- Fluidoterapia (en pacientes crónicamente deshidratados con ERC)
 - IECA (en pacientes no proteinúricos con ERC)
 - IECA (renoprotección en perros con ERC e hipertensión)
 - Terapia alcalinizante (perros acidóticos con ERC)
 - Alimentación asistida (anorexia y malnutrición en perros con ERC)
 - Dietas renales (Estadíos I y II)
-

5.4.11.- Control de la evolución

Según la sociedad IRIS, los controles y monitorización se realizarán según se describe en la Tabla IX.

Tabla IX: Guía del estadiaje y monitorización de ERC en el perro

		Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Azotemia (creatinina mg/dl)		< 1,4	1,4-2	2,1-5	>5
Frecuencia de monitorización	Examen físico	6	4-6	3-6	1-3
	Bioquímica	6	4-6	3-6	1-3
	Hematocrito	6	4-6	3-6	1-3
	Urianálisis	6	4-6	3-6	1-3
	Cultivo orina	6	6	6	3-6
	Presión arterial	6	6	6	3-6

5.4.12.-Factores con valor pronóstico

En los últimos tiempos se han realizado multitud de estudios en los que se intenta establecer los parámetros que tengan un valor pronóstico en pacientes que sufren ERC.

En concreto la HA se ha identificado como factor de riesgo porque reduce la TFG, aumenta el UPC y potencia la lesión renal (lesión tubular, aumento de la matriz mesangial y fibrosis) (Chew y cols., 2011). Los pacientes caninos que al inicio del tratamiento presentan presiones sistólicas más altas (160-201 mmHg) tienen más riesgo de sufrir una crisis urémica, siendo este riesgo 1,4 veces mayor por cada 20 mmHg de aumento de presión (Jacob y cols., 2003).

Otro factor de riesgo identificado en la ERC es la hiperfosfatemia que se ha asociado con una reducción de la supervivencia y una alta morbilidad (Geddes y cols., 2013). En ERC inducida de manera experimental en perros, la hiperfosfatemia se asoció con una progresión más rápida de la ERC y una reducción de la supervivencia (Brown, 1991).

Por último la proteinuria mantenida contribuye a la progresión de la ERC.

5.5.- PROTEÍNAS DE FASE AGUDA (PFA)

La respuesta de fase aguda es una reacción inflamatoria no específica del hospedador y ocurre inmediatamente después de la lesión tisular en respuesta a un estímulo infeccioso, inmunológico, neoplásico, traumático, parasitario, etc. Esta respuesta aguda incluye cambios en la concentración de ciertas proteínas llamadas proteínas de fase aguda (PFA) cuya cuantificación en suero o en plasma aporta una información clínica muy importante en el diagnóstico, monitorización y pronóstico de algunas enfermedades (Ceron y cols., 2008).

Las PFA se pueden clasificar de diferentes maneras (Tabla X)

A.- Según el tipo de variación de sus niveles ante un estímulo.

Las PFA que sufren un descenso en sus niveles durante el transcurso de la respuesta se denominan PFA negativas (ej. albúmina, prealbúmina, paraoxonasa -1 y transferrina); mientras que las que sufren un aumento se denominan PFA positivas (Ceron y cols., 2005; Tvarijonaviciute y cols., 2012a). Dentro de estas últimas se encuentran las principales o aquellas que pueden sufrir un incremento de hasta 1000 veces y las moderadas o aquellas que pueden sufrir un incremento de 100 veces como la haptoglobina, ceruloplasmina, α_1 glicoproteína ácida, antiproteasas y fibrinógeno.

Tabla X: Clasificación de las principales proteínas de fase aguda en el perro

Negativas	Positivas	
	PFA principales	Moderadas
Albúmina	Proteína C Reactiva (PCR)	Haptoglobina
Prealbúmina	Amiloide A Sérico (AAS)	Ceruloplasmina
Transferrina		A1.- Glicoproteína ácida
Paraoxonasa -1		Antiproteasas
		Fibrinógeno

B.- Según su función biológica:

B.1.- Las que intervienen en la defensa del hospedador

Son las proteínas que intervienen en la adaptación o defensa del organismo hospedador frente al patógeno. Entre ellas se encuentran la Prot. CR, amiloide A sérico, componentes del complemento y fibrinógeno.

B.2.- Inhibidoras de serinproteasas:

Estas proteínas limitan la actividad de las enzimas liberadas por las células fagocíticas protegiendo así la integridad de los tejidos del hospedador. Entre ellas se encuentra la $\alpha 1$ -antitripsina y la $\alpha 1$ -antiquimiotripsina.

B.3.- Transportadoras con actividad antioxidante

Estas proteínas protegen los tejidos del hospedador de los metabolitos de oxígeno que son liberados por parte de las células fagocíticas durante la inflamación. Estas son la ceruloplasmina, haptoglobina y hemopexina.

Las PFA presentan una serie de ventajas sobre los métodos tradicionales para detectar la presencia de inflamación. En medicina veterinaria, y en concreto en el perro, la determinación de PFA es particularmente útil en el diagnóstico, pronóstico y evaluación de la respuesta al tratamiento de enfermedades inflamatorias como por ejemplo la leishmaniosis; diagnóstico y pronóstico de procesos tumorales, y evaluación de otros procesos como intervenciones quirúrgicas. A pesar de su utilidad, presentan una baja especificidad para el diagnóstico etiológico, ya que su elevación es indicativo de un proceso inflamatorio pero no permite llegar a conocer su etiología (Martínez-Subiela y cols., 2004).

Con el fin de optimizar el uso de las PFA en pequeños animales Cerón y cols (2008) proponen seguir el siguiente esquema:

- 1.- Utilizar reactivos especie específicos. Los tests rápidos diseñados para ciertas especies requieren ser validados para otras especies en las que quieran ser empleados.
- 2.- Incluir en los perfiles una proteína positiva mayor y otra moderada. Por ejemplo, en el caso del perro un perfil básico puede incluir como proteínas positivas la Prot. CR (mayor), haptoglobina (menor) y como proteína negativa, la albúmina.
- 3.- Los procesos infecciosos e inflamatorios aumentan tanto las proteínas positivas mayores como las moderadas, y descienden las negativas, pero son poco específicas para detectar la causa del proceso; sin embargo los incrementos muy altos de proteínas mayores se asocian con procesos infecciosos (fundamentalmente bacterianos) e inmunomediados.
- 4.- Las PFA pueden servir para diferenciar cuadros clínicos que pueden estar producidos tanto por procesos inflamatorios como no inflamatorios. Por ejemplo pueden servir para diferenciar una poliartritis inmunomediada de una enfermedad degenerativa articular.
- 5.- Cuando se monitorizan en el curso de una enfermedad, el retorno a los valores normales indica una buena respuesta al tratamiento y por lo tanto implica un buen pronóstico.

6.- El incremento de las proteínas inflamatorias en un paciente aparentemente sano puede indicar la presencia de una enfermedad subclínica o puede ser predictivo de la aparición de una enfermedad en un futuro próximo.

7.- La divergencia entre los valores de proteínas mayores y menores pueden aportar información útil. Por ejemplo el incremento de haptoglobina con valores normales de Prot. CR puede ser indicativo de la producción endógena de glucocorticoides.

En medicina veterinaria las PFA se han estudiado en el diversas patologías como Lcan (Martínez-Subiela y cols., 2003; 2011; 2014; Ibba y cols., 2015).

5.5.1.- Proteína C Reactiva (Prot. CR).

Quizá la PFA más estudiada en medicina veterinaria, tanto en procesos agudos como en crónicos, sea la proteína C reactiva.

La concentración sérica de Prot. CR permanece baja en animales sin patología, aumenta 4 horas después de un “insulto” inflamatorio, alcanza su concentración máxima aproximadamente 24 horas después y se normaliza rápidamente cuando la causa de la inflamación se ha resuelto. Se ha investigado como biomarcador en procesos infecciosos (Kocaturk y cols., 2010) y en procesos neoplásicos (Tecles y cols., 2009).

En la monitorización de los pacientes con linfoma canino se ha observado que la concentración de Prot. CR es elevada antes del tratamiento pero no es una herramienta útil para monitorizar la recidiva ya que otros parámetros, como por ejemplo el aumento de los ganglios linfáticos, se alteran antes que la elevación de esta proteína. El tipo de protocolo quimioterápico no afecta a la concentración de Prot. CR, independientemente de que incluya o no corticoesteroides (Merlo y cols., 2007).

En otras enfermedades crónicas como la enfermedad degenerativa valvular mitral se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que padecían estadios iniciales de la enfermedad en relación a los que presentaban estadios más avanzados. Además durante el seguimiento se detectó una correlación positiva entre la troponina I cardiaca y la Prot. CR. Este hallazgo abre la posibilidad de nuevos estudios en cardiología veterinaria en los que se podrían utilizar las PFA con el objetivo de predecir los fenómenos de remodelación cardiaca en pacientes subclínicos clasificados en estadio I de la enfermedad, con o sin cardiomegalia (Polizopoulou., 2015).

Boal y Carreira (2015) han demostrado recientemente que la Prot. CR se puede detectar en el líquido sinovial, utilizando la misma técnica de ELISA que se emplea para la determinación del parámetro en suero. De esta manera, han observado que en pacientes con enfermedad

degenerativa articular, aunque el parámetro en suero permanece dentro de los límites de referencia, en el líquido articular el valor es siempre más bajo.

En relación a los procesos inflamatorios agudos sistémicos la Prot. CR se ha empleado como factor pronóstico. En lo que se refiere al estado inflamatorio, Holm y cols (2007) demostraron que los pacientes con pancreatitis presentaban un valor elevado de Prot. CR, que se reducía a lo largo de la hospitalización. Un estudio realizado en perras con piómetra e inflamación aguda sistémica demostró que, de los parámetros monitorizados FNT- α , IL-6 y la Prot. CR, ésta última era la única que se correlacionaba con el estado de inflamación sistémico (Fransson., 2007).

En lo que se refiere al uso de la Prot. CR como factor pronóstico hay un poco más de controversia. En un estudio reciente realizado en perros con dilatación gástrica se observó que no había diferencias significativas en el valor preoperatorio de Prot. CR entre los supervivientes y los no supervivientes (Uhríkova y cols; 2015). El estudio de Gebhardt y cols (2009) realizado en pacientes con inflamación sistémica afirman que no es el valor inicial, sino el descenso en la concentración de Prot. CR a lo largo de tres días, el factor que predice la supervivencia de estos pacientes. Otro estudio, en pacientes críticos, demostró que el índice de supervivencia a los siete y a los treinta días se correlacionaba inversamente con la albúmina urinaria y con la ratio albúmina/creatinina, pero no con la Prot. CR. Por lo tanto, concluyen que la Prot. CR no es un parámetro que se relacione con la supervivencia (Whittemore., 2011). Por otro lado Torrente y cols., (2015) observaron que en pacientes sépticos o con procesos inflamatorios sistémicos, la magnitud del aumento de la concentración de hierro y del descenso de Prot. CR desde la admisión hasta el alta hospitalaria fue mayor en los supervivientes que en los que fallecieron.

En perros tratados debido a mordedura de serpiente se observó que los niveles séricos de Prot. CR aumentaron considerablemente 24 h post-mordedura, de manera que en este momento se consideró que el 91% de los pacientes padecían inflamación sistémica tomando como referencia un valor de Prot. CR >35 mg/l. Este valor se correlacionó bien con el grado de inflamación y fue superior al valor en el momento de la presentación 6,8 mg/l (Brandeker., 2015).

Brown., 2015 en una infección experimental por *B. gibsoni* en perros demostró que se produjo una respuesta inflamatoria aguda, caracterizada por un marcado incremento de la Prot. CR el día trece post-infección, que precedió a la detección periférica de la parasitemia (expresado como el número total de glóbulos rojos parasitados).

Según Kokaturk y cols (2014), los pacientes con parvovirus canina presentaron concentraciones plasmáticas de Prot. CR más elevadas que los pacientes sanos, aunque la magnitud del incremento fue significativamente más importante en pacientes con signos clínicos más severos (). Una de las causas es aumento de la Prot. CR mayor en las infecciones bacterianas que en las víricas (Gruys y cols., 2015). Por lo tanto en estos pacientes se postula

que el incremento de esta proteína pudiera ser debida a una infección bacteriana secundaria al proceso vírico (Kokaturk y cols., 2014).

5.5.2.- Ferritina sérica (FS).

La ferritina sérica es una proteína citoplasmática globular que almacena hierro. Se considera una PFA (Vanarsa cols., 2012) y en medicina humana se ha propuesto como un marcador de estrés oxidativo.

Su concentración sérica se correlaciona con las reservas de hierro tisular, pudiendo ayudar a diferenciar entre una anemia por deficiencia de hierro, en la que la ferritina sérica está baja, de una anemia debida a inflamación, en la que ferritina sérica está normal o alta. La ferritina aumenta en algunas enfermedades neoplásicas (Feldman 2005); en procesos en los que aumenta el almacenamiento de hierro como la anemia hemolítica, sarcoma histiocítico hemofagocítico o transfusiones de sangre repetidas (Harvey., 2008); en procesos inflamatorios e infecciosos (Harvey, 2008; Silvestrini y cols., 2014).

5.5.3.- Haptoglobina (Hp).

En perros, tanto la haptoglobina como la ceruloplasmina han demostrado ser parámetros más sensibles para la detección de la inflamación que el recuento de glóbulos blancos (Eckershall., 2010).

En pacientes con fallo cardíaco congestivo se han demostrado valores más altos de Hp que en pacientes subclínicos con enfermedad valvular mitral o con lesión moderada. Esto podría indicar que esta proteína es un marcador de inflamación sensible sólo en estados avanzados de la enfermedad (Polizopoulou., 2015).

En braquicefálos con enfermedad obstructiva de las vías respiratorias altas en los que se estudió la respuesta inflamatoria sistémica, la hipoxia y el potencial daño miocárdico, la concentración de haptoglobina no se asoció con la gravedad de los signos clínicos (Planellas, 2012).

En pacientes con dirofilariosis pulmonar Méndez y cols (2014) observaron una divergencia en el comportamiento de la Prot. CR y la Hp. Concretamente, el incremento de la Prot. CR no se acompañaba de un incremento de Hp, e incluso ésta disminuía. Una posible hipótesis es que en estos pacientes existiera una anemia hemolítica subclínica o clínicamente evidente como en los pacientes con síndrome de vena cava. Se especula que pudiera ser que la hemoglobina liberada por los eritrocitos, se una y sature la Hp siendo eliminada de la circulación (Langlois y Delanghe., 1996). Similares divergencias se han encontrado en pacientes con hemólisis intravascular por babesiosis (Matijatko y cols., 2007).

Los pacientes con parvovirus canina tuvieron concentraciones plasmáticas de Hp más elevadas que los pacientes sanos, aunque en los que tenían signos clínicos moderados se observó un

aumento significativo respecto a los que tenían cuadros clínicos más graves (Kokaturk y cols., 2014).

5.5.4.- Paraoxonasa -1 (PON-1)

La paraoxonasa -1 (PON-1) es una enzima asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Sintetizada en el hígado y secretada al plasma, su función es evitar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) mediante la degradación de los peróxidos lipídicos contenidos en los ésteres de colesterol y fosfolípidos (Mackness y cols., 1991) limitando la producción de mediadores proinflamatorios (Watson y cols., 1995).

Se ha descrito como proteína de fase aguda negativa en el perro y otras especies (Tvarijonaviciute y cols., 2012b) y se ha estudiado en el síndrome nefrótico humano (Soyoral y cols., 2011) y en el fallo renal (Gugliucci y cols., 2012).

En el estudio de Tvarijonaviciute y cols (2012b) se comprobó que la actividad de PON-1 aumenta después de la inducción experimental de endotoxemia. La administración de colina, que actúa estimulando la síntesis de acetilcolina, que a su vez activa el sistema simpático y parasimpático, ambos implicados en la respuesta sistémica a la endotoxemia, atenúa estos cambios.

Kokaturk y cols (2014) describieron que los pacientes con parvovirus canina tuvieron concentraciones plasmáticas significativamente más bajas de PON-1 que los pacientes control.

En pacientes caninos con pancreatitis se han demostrado valores significativamente más bajos que en pacientes sanos (Tvarijonaviciute y cols., 2015). Además, PON-1 mostró una correlación negativa con la lipasa sérica, la amilasa, la Prot. CR y Hp; y positiva con el colesterol, la glucosa y el índice de supervivencia

En Lcan se ha descrito en infección experimental y natural (Matinez-Subiela y cols., 2014) durante la monitorización de la enfermedad (Rossi y cols., 2014).

En perros con hiperadrenocorticismismo se han observado valores de PON-1 más altos que en perros sanos; especulándose que puede ser debido al efecto directo de los glucocorticoides endógenos (Tvarijonaviciute y cols., 2015).

La determinación de PON-1 ha tomado mucha importancia en medicina humana y se ha establecido como factor pronóstico de riesgo de lesiones cardiovasculares en pacientes con enfermedad renal crónica sometidos a hemodiálisis (Kotani y cols., 2011). En general las paraoxonasas aparecen como "cazadores" de viejos y nuevos sustratos a menudo involucrados en aterosclerosis y trombogénesis.

La adiponectina es una citoquina derivada del tejido adiposo y tiene un peso de 30 kDa (Maeda y cols., 1996). En medicina humana se ha demostrado que está involucrada en la función

glomerular (von Eynatten, 2009). En perros, al igual que en medicina humana, tiene funciones relacionadas con la obesidad y con la inflamación (Ishioka y cols., 2006). En el estudio realizado por Tvarijonaviciute y cols (2012a) en perros con leishmaniosis se puso de manifiesto que los pacientes con proteinuria y azotemia presentaban valores más elevados de adiponectina sérica que aquellos que tenían proteinuria pero no azotemia. En dicho estudio el valor de este marcador en orina fue mayor en presencia de proteinuria, y se encontró una correlación positiva tanto entre la creatinina sérica y la adiponectina sérica y urinaria, como con la ratio adiponectina urinaria sérica. Todos estos hallazgos sugieren la posible utilidad de esta proteína como marcador de lesión renal.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Población de estudio

6.1.2.- Criterios de inclusión

Se incluyeron 20 pacientes caninos atendidos en el Hospital Clínico Veterinario Complutense (HCVC) entre Noviembre de 2011 y Junio de 2015.

Se definieron los siguientes criterios de inclusión:

- 1.- Signos clínicos y/o analíticos compatibles con leishmaniosis.
- 2.- Confirmación del diagnóstico por serología mediante inmunofluorescencia (IFI) con un título superior a 1/400
- 3.- Sin haber recibido ningún tratamiento leishmanicida en los últimos 2 meses previos a la inclusión
- 4.- Ausencia de otras enfermedades vectoriales descartadas según su procedencia o historial de viajes.
- 5.- Ausencia de otras enfermedades sistémicas inflamatorias y/o inmunomediadas, así como patologías cardíacas y/o hepáticas graves en el momento del diagnóstico.

Una vez confirmado el diagnóstico de leishmaniosis y valorado el cumplimiento de los criterios de inclusión, se procedió a informar convenientemente del protocolo de estudio a sus propietarios y se les solicitó firmar un consentimiento informado a aquellos que accedieron a que su mascota formara parte del estudio objeto de esta Tesis doctoral.

6.1.3.- Evaluación y clasificación de los pacientes

Se establecieron tres tiempos de estudio: antes del tratamiento (D0), a los 30 días una vez finalizado el tratamiento (D30) y a los 90 días desde el inicio del tratamiento (D90).

En las tres visitas se realizó una exhaustiva exploración física, que incluyó la monitorización de la presión arterial así como la toma de muestras.

El estado clínico se monitorizó en base a un esquema de evaluación constituido por 16 signos clínicos estableciendo categorías de menor a mayor gravedad. Las puntuaciones para cada parámetro se sumaron para obtener una puntuación clínica (PC) final con un máximo de 37 puntos (Tabla I).

Tabla I. Descripción de los signos clínicos establecidos en la exploración clínica para calcular la puntuación clínica de cada paciente.

Signos clínicos	Gradación			
	0	1	2	3
Apetito	Normal	Disminuido	Anorexia	-
Astenia	Ausencia	Leve	Severa	-
Temperatura	Normal	-	Hipo/Hipertermia	-
Condición corporal	Normal (3/5)	Delgado(2/5)	-	Caquexia (1/5)
Poliuria/Polidipsia	Ausencia	-	-	Presencia
Atrofia muscular	Ausencia	Leve	Severa	-
Linfadenomegalia	Ausencia	Localizada	-	Generalizada
Manifestaciones oculares	Ausencia	-	Presencia	-
Palidez mucosas	Ausencia	-	Presencia	-
Epistaxis	Ausencia	-	-	Presencia
Vómitos	Ausencia	Ocasionales	Frecuentes	-
Diarreas	Ausencia	Ocasional	Frecuente o melena	-
Cojera/dolor articular	Ausencia	-	-	Presencia
Manifestaciones cutáneas: Forma	Ausencia	-	Presencia	-
Dermatitis exfoliativa	Ausencia	Localizada	generalizada	-
Hiperqueratosis generalizada	Ausencia	-	Presencia	-

Los análisis realizados en cada tiempo de estudio y en todos los perros (siempre que fue posible) fueron:

- D0: Hemograma y bioquímica sanguínea (Ca-P, proteínas plasmáticas totales, urea, creatinina, ALT) IFI, proteinograma, PCR anidada y qPCR, aspirado de médula ósea, tasa de filtración glomerular (TFG), análisis de orina completo, relación proteína/creatinina en orina (UPC), electroforesis de proteínas en orina
- D30: creatinina, proteinograma, electroforesis de proteínas en orina
- D90: Hemograma y bioquímica sanguínea (Ca-P, proteínas plasmáticas totales, urea y creatinina), IFI, proteinograma, PCR anidada y qPCR, aspirado de médula ósea, TFG, análisis de orina completo, UPC, electroforesis de proteínas en orina.

Dado que este estudio se realizó en animales con propietario no fue éticamente posible realizar procedimientos invasivos como biopsias renales seriadas.

Los pacientes fueron clasificados según las recomendaciones de la Sociedad de Interés Renal (IRIS) en función de la azotemia, de la presión arterial y la proteinuria.

El presente estudio contó con la aprobación del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

6.1.4.- Grupos de tratamiento

Se realizaron dos grupos de tratamiento aleatoriamente por estricto orden de llegada al Hospital en la primera visita:

Grupo G: Los pacientes recibieron tratamiento con Glucantime® (Laboratorios Merial, España) y Alopurinol® (producto genérico)

Grupo M: los pacientes recibieron tratamiento con Milteforán® (Laboratorios Virbac, Francia) y Alopurinol® (producto genérico).

A continuación se detallan las dosis para cada uno de los tres principios activos empleados:

- Antimoniato de n-metil glucamina: 100 mg/kg/día SC durante 28 días, Glucantime®.
- Miltefosina: 2 mg/kg/24h PO durante 28 días, Milteforan® 20mg/ml.
- Alopurinol 20 mg/kg/día PO durante 6 meses.

Además los pacientes de ambos grupos que presentaron proteinuria superior a 0,4 recibieron benazeprilo a razón de 0,25-1 mg/kg/12h por vía oral acompañado de dieta renal; los pacientes que tuvieron presión sistólica superior a 160 mmHg y no respondieron a la administración de benazeprilo recibieron además un tratamiento anti-hipertensor con un bloqueante de los canales del calcio (amlodipino 0,2-0,4 mg/kg/día) y en los que se detectó hipoalbuminemia se administró ácido acetil salicílico 0,5 mg/kg/día.

6.2. Metodología y determinación de marcadores

6.2.1. Medición de la presión arterial

La presión arterial se determinó en cada una de las visitas tras un periodo de acostumbramiento de 10 minutos con el objetivo de reducir el estrés asociado a la prueba. El tamaño del manguito se adaptó al 40% del diámetro de la extremidad, realizándose las medidas siempre en la misma posición y en la misma extremidad para cada paciente.

En pacientes con un peso superior a 10 kg las mediciones se llevaron a cabo con un método oscilométrico (Advisor® Vital Signs Monitor Surgivet) y en los de peso inferior a 10 kg con el método Doppler unidireccional (Uni Huntleigh Vettex®).

En todos los casos se tomaron siete medidas de presión arterial, descartándose la primera y realizando la media aritmética de las restantes. Los pacientes se consideraron hipertensos cuando la presión sistólica era superior a 160 mmHg (Brown y col., 2007).

6.2.2. Diagnóstico inmunológico

6.2.2.1.- Método de inmunofluorescencia indirecta

La determinación del título de anticuerpos anti-*L. infantum* se llevó a cabo mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Para la realización de la técnica se utilizaron portaobjetos en los que el antígeno (promastigotes de *L. infantum*) ya estaban fijados previamente. Las diluciones seriadas del suero problema, así como los controles positivos y negativos se dispensaron en los diferentes pocillos del portaobjetos, incubando a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda. Después se realizaron tres lavados con PBS 1x durante 10 min. Se deja secar al aire y se añade 10 µl del conjugado (Fuller, anti IgG *canine*) en todos los pocillos, incluido el blanco y controles positivo y negativo. Tras una incubación a 37°C durante 30 min, en placa de Petri húmeda y en oscuridad; se procedió a realizar tres lavados con PBS 1x (10 min) en oscuridad, y a hacer un último lavado con agua destilada. Una vez secado el portaobjetos se procedió al montaje del mismo con un cubreobjetos de 40x60 mm y glicerina tamponada (Fluopred, Biomerieux). La lectura de las preparaciones se realizó con un microscopio de fluorescencia (Nikon E4000), estableciéndose como título la última dilución del suero en la que el promastigote aparece fluorescente. Se consideró positivo aquel suero que presentara un título de anticuerpos igual o superior a la dilución 1:100 (Mancianti y Meciani, 1988)

6.2.2.2.- Electroforesis de proteínas plasmáticas

La separación electroforética de las proteínas plasmáticas se llevó a cabo utilizando como soporte tiras de acetato de celulosa gelatinizado (Sigma-Aldrich) bajo las siguientes condiciones: tampón veronal sódico 40 mM a pH 8,5 y 2 mA por tira durante 30 min. Posteriormente, las distintas fracciones protéicas, teñidas con Negro Amido 10B, se cuantificaron mediante densitometría (Optiscan[®], Helena Laboratories).

6.2.3.- Diagnóstico parasitológico

6.2.3.1.- Microscopía óptica

Las extensiones obtenidas a partir de la centesis de médula ósea y/o linfonódulo y fijadas con metanol durante cinco minutos se tiñeron con Giemsa en una dilución 1:20 con agua destilada durante 20 minutos. Posteriormente, fueron lavadas con agua destilada y secadas al aire. A continuación, se observaron al microscopio óptico para la visualización de amastigotes de *L. infantum* en el interior de los macrófagos o libres en la preparación

6.2.3.2.-Diagnóstico molecular

A.- Extracción de ADN

Para la extracción de ADN a partir de médula ósea, linfonódulo, tejidos y orina se utilizó el kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) siguiendo los protocolos definidos por el fabricante. Modificando dicho protocolo en los siguientes aspectos para adaptarlo a nuestras condiciones de trabajo:

- El volumen inicial de médula ósea o/o linfonódulo osciló entre 50-150 μ L en función de la calidad, cantidad y estado de la muestra. El volumen de elución fue de 200 μ L con agua destilada estéril.
- Para la orina, se partió de un volumen inicial de 1,8 mL de orina (hasta llenar el *eppendorf*), previamente resuspendida, se centrifugó 10 min, se retiró el sobrenadante, se añadieron 20 μ L de Proteinasa K, 180 μ L de *buffer* ATL y se incubó a 30 minutos a 56°C. Después se continuó según el protocolo aportado por el fabricante. El volumen de elución fue de 100 μ L con agua destilada estéril.
- Para los tejidos, se obtuvieron 25 mg de cada tejido en solución salina fisiológica. El volumen de elución fue de 200 μ L con agua destilada estéril.

El ADN purificado se almacenó a -20°C hasta su utilización posterior.

B.- Determinación de la carga parasitaria mediante PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR).

Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) para la determinación de la carga parasitaria de *L. infantum* en muestras de médula ósea o linfonódulo. Para ello se utilizó el termociclador Corbett 5Plex Rotorgene 6000 (QIAGEN), la sonda Taq Man (5'-FAM-TGGGTGCAGAAATCCCGTTCA-3'-BHQ1) y un par de cebadores específicos (5'-AAAATGGCATTTCGCGGCC-3' y 5'-GGCGTTCTGCGAAAACCG-3') que amplifican un fragmento de 117 pb de ADN minicircle de kinetoplasto (kADN). El programa de amplificación consistió en una incubación inicial de 2 min a 50°C, seguido por 10 min de desnaturalización a 95 °C, y 40 ciclos a 95°C durante 15s y 60°C durante 1 min cada uno. En cada reacción de amplificación se incluyó un control negativo y uno positivo (muestra con ADN genómico de *L. infantum*). Cada muestra se analizó por duplicado. La carga parasitaria de ADN se determinó en cada muestra tras la comparación de los datos con una curva estándar específica basada en el número de parásitos por mililitro de volumen extraído (Vitale et al., 2004; Lombardo et al., 2012).

C.- PCR anidada:

Se realizó una PCR anidada de la región variable del gen codificante de SSUrRNA (Adaptado y Modificado de Cruz I y cols., 2002).

Los cebadores empleados para la primera amplificación fueron R221 (5'-GGTTCCTTTCCTGATTTACG - 3') y R332 (5'- GGCCGGTAAAGGCCGAATAG - 3') específicos del kinetoplasto. Estos cebadores permiten amplificar un fragmento de 603 pares de bases.

Para la primera reacción de PCR se añadieron 20 µl de ADN problema a 30 µl de reacción. Cada reacción contenía 15 pmol de cada cebador (R221 y R332) (SIGMA-ALDRICH), 5 µl *Buffer* 10X, 2mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix, 1,4 unidades de Tth DNA polimerasa (1U/ul) (Biotools, España).

El programa del termociclador (GenAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems, España) fue el siguiente: 80°C durante 2 minutos, 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, *annealing* 60°C durante 30 segundos y extensión de 72°C durante 30 segundos) y extensión final de 72°C durante 5 minutos.

Para la segunda amplificación se usaron los cebadores R223 (5'-TCCCATCGCAACCTCGGTT - 3') y R333 (5'- AAAGCGGGCGCGGTGCTG - 3') (SIGMA) que se unen específicamente a una región interna del producto obtenido con la primera reacción de PCR, siendo específicos para el género *Leishmania*. Con ellos se obtiene un producto de 353 pb.

En la segunda reacción de PCR, 10 µL de una dilución 1/40 con agua destilada esterilizada del primer producto de la PCR fueron añadidos a 15 µl de reacción. Cada reacción contenía 7,5 pmol del primer R223, 3,75 pmol del primer R333 (Sigma-Aldrich), 2,5 µL *Buffer* 10X, 2mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix, 0.7 µl de Tth DNA polimerasa (1U/ul) (Biotools, España).

El programa del termociclador fue de 80°C 2 min, 94°C 5 min y después 30 ciclos de 94°C 30 seg, 65° 30seg, 72° 30seg seguido de 72°C 5 min y 4°C.

Todos los productos de la PCR fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1x (Roche 10X). Para su visualización se empleó la tinción con SYBR 10000X (Invitrogen, España) y un transiluminador de Bio-RAD.

6.2.4. Parámetros hematológicos y bioquímicos

6.2.4.1.- Hemograma

Los parámetros del hemograma se obtuvieron en un analizador hematológico basado en la tecnología de la citometría de flujo laser (ADVIA 120[®], Siemens Healthcare). El recuento diferencial leucocitario se realizó a partir de un frotis sanguíneo.

6.2.4.2.- Perfil bioquímico

La valoración de la concentración plasmática de urea, creatinina y alanino aminotransferasa (ALT) se realizó con técnicas de química seca y espectrofotometría de reflectancia (Sistema Reflotron[®], Roche Diagnostics). Para determinar la concentración sérica de calcio y fósforo se emplearon técnicas de química líquida espectrofotométricas (O-cresoftaleína complexona y fosfomolibdato enzimático, respectivamente).

6.2.5.- Parámetros de funcionalidad renal

6.2.5.1.- Tasa de filtración glomerular (TFG)

La TFG se determinó en D0 y D90, mediante el aclaramiento de creatinina exógena, previo ayuno de 12 horas de sólidos y líquidos según la técnica descrita por Watson y cols., 2002. Todos los pacientes tuvieron acceso libre al agua durante todo el tiempo que duró la prueba.

Se administró creatinina por vía endovenosa (Creatinina anhidra Sigma Aldrich[®]), diluida en SSF 0,9% en campana de flujo laminar de la que se realizaron partes alícuotas a una concentración de 50 mg/ml que se conservaron a - 40°C, hasta su posterior utilización (previa descongelación en baño a 37°C).

Previo cateterización de la vena cefálica se inyectaron 40 mg/kg de la citada creatinina durante un periodo de 5 minutos.

La determinación plasmática de la creatinina se realizó antes de la inyección (muestra basal, minuto 0) y a los 5, 10, 60, 90, 120, 210, 360, 600 min pos inyección; recogiendo las muestras de una vía diferente al punto de inyección, pero siempre de la misma en cada paciente.

Las muestras fueron congeladas a -40°C hasta su posterior análisis.

El análisis de la muestra se realizó con el software *Creatinine clearance calculator* (Royal Canin Ibérica SA, Madrid, Spain).

6.2.5.2.- Urianálisis

El análisis de la orina se realizó en D0, D30 y D90. En todos los casos, las muestras de orina fueron aleatorias y se tomaron mediante cistocentesis guiada por ecografía. Para ello se empleó una aguja hipodérmica de 22G, extrayéndose entre 10-20 ml según el tamaño del paciente.

Inmediatamente después de la extracción se realizó el análisis químico con tiras reactivas de urianálisis (Combur[®], Roche Diagnostics), el estudio del sedimento urinario, la determinación de la densidad urinaria, mediante refractometría, y el UPC. Todas las orinas se centrifugaron durante 10 minutos a 1.100 g, congelándose el sobrenadante a -40°C hasta realizar la separación electroforética de las proteínas urinarias de acuerdo a su masa molecular.

6.2.5.3.- Ratio proteína/creatinina en orina (UPC)

La concentración de proteínas urinarias se determinó mediante la técnica colorimétrica espectrofotométrica del rojo de pirogalol molibdato, mientras que la creatinina en orina se valoró con el método enzimático de la creatinina aminohidrolasa. Para el control de la calidad se utilizó *Urine control level-2* (Randox). El UPC se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{UPC} = \text{proteínas (mg/dl)} / \text{creatinina (mg/dl)}.$$

Los pacientes se clasificaron en base al UPC, y según los valores discriminantes descritos por la Sociedad Internacional de Interés Renal (IRIS), como: UPC < 0,2 paciente no proteinúrico, UPC 0,2 - 0,5 paciente con proteinuria *border line*, UPC > 0.5 paciente proteinúrico.

6.2.5.4.- Separación electroforética de las proteínas urinarias de acuerdo a su masa molecular

Se realizó en 18 muestras de orina, excluyéndose las muestras de los pacientes G12 y M20 por presentar infección del tracto urinario. La separación se llevó a cabo mediante electroforesis vertical desnaturalizante en gel de poliacrilamida (4-15%) con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) según la técnica de Laemmli 1970.

Material

- Concentrador de muestras (Minicon CS15 Clinical Sample Concentrator[®], Merck Millipore).
- Tampón de electroforesis Tris/glicina/SDS 10 x : 25mM Tris-ClH, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3.
- Tampón de Laemmli para la concentración de la muestra: 62,5 mM Tris-HCL pH: 6,8, 2%SDS, 25% glicerol para incrementar la densidad de la muestra y 0,01% azul de bromofenol.
- 2-Mercaptoetanol
- Geles de acrilamida SDS con 4% acrilamida en el gel concentrador y 15% en el gel de resolución y 10 pocillos de muestra de 50 µl (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels[®] 4-15 %, Bio-Rad).
- Solución colorante: *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,2%, metanol 45%, ácido acético 2%.

- Solución decolorante: metanol 20%, ácido acético 10%, glicerol 1%.
- Solución de conservación: glicerol 6%, ácido acético 4%.
- Marcadores de peso molecular: mezcla de diferentes proteínas preteñidas con rango de masas moleculares comprendidas entre 10 y 250 kDa (Precisión Plus Protein[™] Standards Unstained[®], Bio-Rad)
- Cubeta de electroforesis vertical (Mini- PROTEAN Tetra Cell[®], Bio-Rad)
- Fuente de alimentación (PowerPac 300[®], Bio-Rad)
- Densitómetro (GS 800[®], Bio-Rad)
- Programa informático para el tratamiento de los barridos electroforéticos escaneados (Quantity one[®], Bio-Rad)

Método

Las muestras de orina con una concentración de proteínas inferior a 50 mg/dl fueron concentradas con el concentrador Minicon CS15[®] (Merck Millipore) hasta alcanzar una concentración mínima de proteínas de 50 mg/dl. Esta concentración obedece a que en ensayos previos de dosis-respuesta (cantidad de proteína en el gel frente a resolución de bandas proteicas) se comprobó que la cantidad óptima de proteínas a inyectar en el gel es de 10 µg en un volumen máximo de 40 µl. Este volumen evita la mezcla entre muestras situadas en pocillos adyacentes.

- Preparación de la muestra: diluir 1/4 el tampón Lammeli 4x y adicionar glicerol (8:1) y β-mercaptoetanol (19:1) como agente reductor. Mezclar la solución resultante con la orina a partes iguales.
- Calentar la muestra 4 min. en un baño de agua a 90°C para desnaturalizar.
- Llenar las cámaras de la cubeta de electroforesis con tampón frío TRIS/glicina/SDS diluido a 1 x de modo que cubra ambos extremos del gel.
- Extraer el gel de la bolsa que lo contiene y quitar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos de muestra y aclararlos con agua destilada. Introducir el gel en la cubeta de electroforesis.
- Depositar el volumen de muestra que contenga 10 µg de proteínas en cada pocillo con pipeta automática y puntas especiales para sembrar geles
- En todos los geles, se depositaron los marcadores de peso molecular en el pocillo número uno, seguido por la orina de tres pacientes de los días D0, D30 y D90 de manera correlativa para cada paciente; de esta forma, se evitan las variaciones interensayo entre muestras de un mismo paciente.

- Conectar la cubeta a la fuente de alimentación y aplicar 200 V hasta que el frente de migración (visible por la banda azul de bromofenol) alcanza el extremo inferior del gel.
- Introducir el gel en una cubeta con solución colorante (*Coomassie Brilliant Blue*) y mantenerlo en agitación durante 30 min.
- Pasar el gel a la solución decolorante y mantenerlo en agitación hasta que el fondo del gel quede transparente.
- Conservar el gel en la solución de conservación.

Análisis de los trazados electroforéticos

Los trazados electroforéticos fueron escaneados y digitalizados con el densitómetro GS 800® (Bio-Rad) y el programa *Quantity one* (Bio-Rad). Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa *Image Lab* (Bio-Rad) obteniéndose los siguientes parámetros: cantidad de bandas en cada calle, peso molecular (PM) de cada banda en relación a los PM de los estándares y porcentaje de densidad óptica de cada banda. Finalmente, se sumaron las densidades ópticas de las bandas localizadas por encima del rango de PM para la albúmina, 56,2-68,8 kDa, y por debajo. Las primeras corresponden a la suma de las densidades ópticas de las proteínas de alto peso molecular (PAPM) y las segundas a las de bajo peso molecular (PBPM).

6.2.6. Proteínas de fase aguda (PFA)

La determinación de las proteínas de fase aguda se llevó a cabo en la Facultad de veterinaria de Murcia, Laboratorio Interdisciplinar de Análisis Clínicos, mediante las siguientes técnicas analíticas. Todos los métodos están validados para perro y presentan una imprecisión intra e interensayo de menos del 10%.

Proteína C reactiva (Prot. CR): Se determinó mediante turbidimetría (CRP OSR 6147 Olympus Life and Material Science Europe GmbH).

Haptoglobina (Hp): Se determinó mediante un método colorimétrico comercial (*Tridelta phase range haptoglobin kit*, Tridelta Development Ltd.).

Ferritina (FS): Se determinó mediante turbidimetría en un analizador químico clínico automatizado (Olympus AU2700, Olympus Diagnostica GmbH) utilizando anticuerpos policlonales anti-ferritina humana (*Tina quant Ferritin*, Roche).

Paraoxonasa-1 (PON-1): Se determinó en un analizador químico clínico automatizado (Olympus AU2700, Olympus Diagnostica GmbH) usando como sustrato p-nitrofenilacetato.

La albúmina se analizó en la Facultad de Veterinaria de Madrid como parte del proteinograma.

6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue llevado a cabo con el programa SAS 9.4, en el centro de cálculo de la UCM.

6.3.1. Estadística descriptiva

Se calculó la media, mediana, desviación estándar, rango intercuartílico, valor mínimo y máximo de cada una de las variables en los dos grupos de estudio.

6.3.2.-Comparativa de medias e influencia de factores:

Los datos que se ajustaron a una distribución normal se analizaron mediante la T de Student, test de Duncan, ANOVA y ANOVA bifactorial; mientras que para los datos que no seguían una distribución normal se emplearon test no paramétricos: suma de rangos de Wilcoxon y test de rangos signados de Wilcoxon.

Para evaluar las variables categóricas se empleó el test de Chi-cuadrado y test de McNemar.

6.3.3.- Correlaciones:

Para detectar y cuantificar la relación entre las variables del estudio se empleó el test la correlación de Spearman.

En todos los análisis realizados, se consideró un nivel de confianza del 95% (riesgo del 5%), por lo que las diferentes estadísticas se consideraron significativas para un valor de $p < 0,05$.

7.- RESULTADOS

7.- RESULTADOS

7.1. INTRODUCCIÓN

En el análisis descriptivo de los pacientes en el momento de la primera consulta (Día 0), se mencionará para cada apartado únicamente el número de pacientes y porcentaje que presentaron una alteración concreta, debido a que en este momento todavía no se habían clasificado los grupos de tratamiento. La base de las gráficas se encuentra numerada del 1 al 20, correspondiendo del 1 al 12 (inclusive) con los futuros pacientes del Grupo G (Glucantime/alopurinol) y del 13 al 20 con los futuros pacientes del Grupo M (Miltefosina/alopurinol).

Posteriormente, en el análisis descriptivo por grupos a lo largo del tiempo se detallará exactamente el paciente concreto que presenta dicha alteración en cada momento.

En el anexo se encontrarán los valores exactos de cada parámetro, para cada paciente y en todos los tiempos.

7.2.- ANALISIS DESCRIPTIVO

7.2.1.- ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA EN LA PRIMERA VISITA (D0).

7.2.1.1- Parámetros clínicos:

A.- Descripción de los perros incluidos en el estudio:

Tabla I: Reseña de todos los pacientes del estudio. Peso en la primera visita (D0)

Paciente	Grupo	Sexo	Raza	Edad (años)	Peso (kg)
1	G1	♂	Teckel	7	13,1
2	G2	♂	Pointer	6	24
3	G3	♂	Teckel	6	10,4
4	G4	♂	Bulldog inglés	7	20,8
5	G5	♀	Labrador	10	26,5
6	G6	♂	Pastor de Brie	5	34,6
7	G7	♂	Doberman	3	32,8
8	G8	♀	Mestizo	4	17,1
9	G9	♂	Bulldog francés	2	12,5
10	G10	♂	Staffordshire	2	16,7
11	G11	♂	Mestizo	5	16
12	G12	♂	Mestizo	6	33,8
13	M1	♂	Cocker	1	11,3
14	M2	♂	Carlino	6	9
15	M3	♀	Mastin Español	6	45
16	M4	♂	Boxer	8	33,5
17	M5	♀	Pastor Alemán	4	26,7
18	M6	♀	Husky	8	24
19	M7	♀	Mestizo	13	5
20	M8	♀	Doberman	7	29,6

Como se muestra en la Tabla I en el estudio se incluyeron 20 perros de ambos sexos, 14 machos y 6 hembras, con edades comprendidas entre 1 y 13 años (con la mayoría comprendida entre 6 y 8 años), y de diferentes razas: mestizos (4), Doberman (2), Teckel (2), Bóxer, Bulldog Francés, Bulldog Inglés, Carlino, Cocker Spaniel, Husky Siberiano, Labrador Retriever, Mastín Español, Pastor Alemán, Pastor de Brie, Pointer y Stafforshire Terrier

B.- Puntuación clínica (PC):

El rango de la puntuación clínica (PC) fue variable entre 0 y 17. La PC de todos los pacientes en la exploración física de la primera visita se recoge en la Tabla II y el análisis descriptivo en las Tablas I, II, III y IV del anexo. En general ningún paciente presentó la máxima puntuación (37), situándose la media en 8,65.

Tabla II: Puntuación clínica de todos los pacientes en la primera visita (D0)

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
PC	7	8	6	12	2	10	9	12	2	6	14	10

Paciente	13	14	15	16	17	18	19	20
Grupo	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
PC	0	5	12	8	14	12	7	17

Las manifestaciones clínicas observadas se describen a continuación:

- 1.- 2/20 perros (10%) presentaron apetito disminuido.
- 2.- 8/20 pacientes (40%) presentaron astenia leve.
- 3.- 4/20 perros (20%) presentaron alteración de la temperatura.
- 4.- 10/20 pacientes (50 %) presentaron una condición corporal delgada.
- 5.- 5/20 perros (25%) presentaron polidipsia/poliuria (PU/PD)
- 6.- 4/20 pacientes (20%) presentaron atrofia muscular.
- 7.- 13/20 perros (65%) presentaron linfadenomegalia.
- 8.- 5/20 pacientes (25%) presentaron manifestaciones oculares. Las más frecuentes fueron conjuntivitis, epiescleritis, depósitos lipídicos en la córnea y un paciente presentó ceguera súbita causando atrofia de retina debido a hipertensión mantenida.
- 9.- 4/20 perros (20%) presentaron palidez de mucosas
- 10.- 3/20 pacientes (15%) presentaron epistaxis.
- 11.- Un paciente presentó vómitos.
- 12.- Ningún paciente presentó diarreas.
- 14.- 6/20 perros (30%) presentaron cojeras. En un caso de la extremidad anterior derecha, en otro caso de la posterior izquierda y el resto de los casos presentaron cojeras alternas de diferentes miembros.
- 15.- En siete casos se observaron alteraciones cutáneas en forma ulcerativa.

- 16.- 12 pacientes (60%) presentaron dermatitis exfoliativa
- 17.- 8 (40%) casos presentaron hiperqueratosis generalizada.
- 18.- El paciente n°20 además sufrió un episodio de diarrea hemorrágica entre la visita 30 y 90, requiriendo hospitalización y transfusiones de sangre.
- 19.- 2/20 pacientes (10%) (números 9 y 10, futuros G9 y G10) desarrollaron intolerancia a la miltefosina manifestada por astenia y síntomas digestivos, sin respuesta a los tratamientos convencionales, y un mes después del aclaramiento del fármaco se les pasó al Grupo G.
- 20.- El paciente número 6 (futuro G6) desarrolló estibointoxicación por antimoniales manifestando fallo renal agudo a los 15 días del tratamiento. Por este motivo permaneció hospitalizado durante una semana recibiendo tratamiento de cuidados intensivos.
- 21.- Al finalizar el tratamiento se diagnosticó hipotiroidismo en 2/20 pacientes (10%) (números 14 y 18, futuros M2 y M6).
- 22.- 2/20 pacientes (10%) presentaron una infección de orina. Uno de ellos por una epididimitis (paciente número 20, futuro M8) en D0 causada por *Streptococcus spp* sensible a amoxicilina clavulánico y otro por una cistitis (paciente número 12, futuro G12) D90 sensible a Mabofloxacin. Ambos pacientes fueron excluidos del estudio del UPC y de la electroforesis de proteína en orina debido a las infecciones urinarias.

C.- Peso:

En la Tabla I se detalla el peso, del total de los pacientes incluidos en el estudio en el momento de la primera visita. Aunque el peso medio fue de 22,12 kg, el peso fue muy variable desde los 5 (n° 19) a los 45 kilos (n°15).

D.- Presión arterial sistólica (PAS):

En la Tabla III se detallan las presiones arteriales sistólicas de cada paciente en el momento de la primera visita. La prevalencia de hipertensión en la población de estudio fue del 42% (8/19). La media se situó en 153,3 mm Hg y el valor máximo registrado fue de 240 mm Hg.

Tabla III: Presiones arteriales sistólicas (PAS) de todos los pacientes en la primera visita (D0) (Sd sin determinar).

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
PAS mmHg	240	152	240	134	Sd	141	139	134	124	136	164	156

Paciente	13	14	15	16	17	18	19	20
Grupo	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
PAS mmHg	104	170	141	115	142	135	180	166

La clasificación del riesgo asociado a la presión arterial según los criterios IRIS fue la siguiente (Figura 1):

1.- En el estadio IRIS R, 4/20 pacientes (25%) presentaron riesgo 0, 1 paciente presentó riesgo 1 y otro, riesgo 3.

2.- En el estadio IRIS I, 6/20 pacientes (30%) presentaron riesgo 0, 2/20 (10%) riesgo 1 y 2/20(10%) riesgo 3. En uno de los pacientes de este grupo no se determinó la presión arterial.

3.- En el estadio IRIS II, 1/20 paciente (5%) presentó riesgo 0, 1/20 (5%) presentó riesgo 1, 1/20 (5%) riesgo 2.

(Riesgo 0 = PS: < 150 mmHg, riesgo 1 = PS: 150-159 mmHg, riesgo 2 = PS: 160-179 mmHg, riesgo 3 ≥ 180 mmHg)

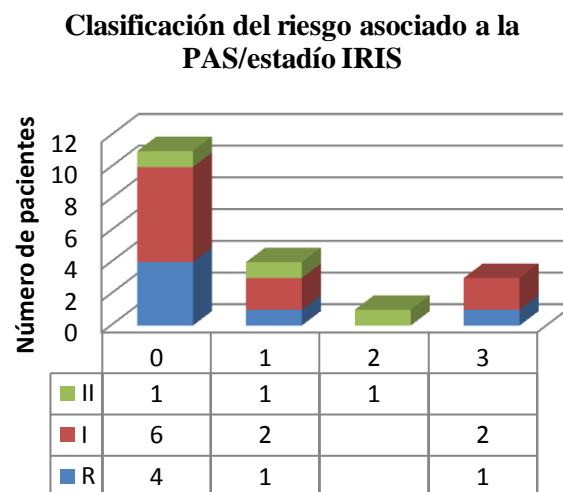


Figura 1: Representación del riesgo asociado a la presión arterial en los pacientes incluidos en el estudio según la clasificación IRIS.

7.2.1.2.- Resultados del diagnóstico parasitológico e inmunológico:

A.- PCR:

Como se muestra en la Tabla IV se confirmaron los pacientes positivos mediante PCR anidada de aspirado de médula ósea o linfonódulo poplíteo. Se muestra también la carga parasitaria obtenida mediante PCR a tiempo real.

Los resultados de la valoración de la citología de médula ósea (muestra obtenida mediante aspiración) para evidenciar la presencia o ausencia de parásitos, se refleja también en la Tabla IV.

En todos los pacientes y todas las visitas, se realizó una PCR anidada de orina, que en todos los casos fue negativa (Tabla IV).

Tabla IV: Citología de medula ósea, PCR anidada de médula ósea y orina, qPCR (PCR cuantitativa a tiempo real) de médula/ganglio en la primera visita D0 (POS positivo, NEG negativo, sd sin determinar)

Paciente	Grupo	Médula ósea			Linfonódulo		Orina
		Citología	PCR anidada	qPCR	PCR anidada	qPCR a	PCR anidada
1	G1	POS	POS	0	sd	sd	NEG
2	G2	POS	POS	0,07	sd	sd	NEG
3	G3	Sd	sd	sd	sd	sd	sd
4	G4	POS	NEG	sd	sd	sd	NEG
5	G5	POS	NEG	sd	sd	sd	NEG
6	G6	POS	POS	0	sd	sd	NEG
7	G7	NEG	POS	3,143	sd	sd	NEG
8	G8	POS	POS	0,008	sd	Sd	NEG
9	G9	POS	sd	sd	POS	40,36	NEG
10	G10	NEG	Sd	Sd	POS	0,871	NEG
11	G11	NEG	POS	0.02	sd	sd	NEG
12	G12	sd	sd	sd	sd	sd	sd
13	M1	sd	sd	sd	sd	sd	sd
14	M2	POS	POS	1,741	sd	sd	NEG
15	M3	NEG	NEG	sd	sd	sd	NEG
16	M4	NEG	NEG	sd	sd	sd	NEG
17	M5	POS	POS	0,012	sd	sd	NEG
18	M6	POS	POS	0.006	sd	sd	NEG
19	M7	NEG	POS	1,441	sd	sd	NEG
20	M8	NEG	POS	0,445	sd	sd	NEG

B.- IFI y proteinograma:

En la Tabla V se muestra el título de anticuerpos de los pacientes en la primera visita D0 que varió desde 1/200 hasta 1/6400. Aunque no entraba dentro de los criterios de inclusión se

decidió incluir en el estudio al paciente con una titulación de IFI de 1/200 debido a que manifestaba signos clínicos y alteraciones laboratoriales evidentes de enfermedad.

Tabla V: IFI de todos los pacientes en la primera visita (D0)

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
IFI	1/800	1/1600	1/1600	1/800	1/400	1/800	1/1600	1/1600	1/6400	1/6400	1/6400	1/3200

Paciente	13	14	15	16	17	18	19	20
Grupo	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
IFI	1/400	1/6400	1/800	1/200	1/6400	1/1600	1/800	1/1600

En la Tabla VI se detalla el proteinograma de cada paciente en el momento de la primera visita. En relación a la albúmina, 15/20 (75%) presentaron hipoalbuminemia con valores por debajo del rango de referencia; 10/20 (50%) hiperglobulinemia con valores de globulinas totales por encima del rango de referencia; 17/20 (85%) presentaron valores de A/G por debajo del rango de referencia y 13/20 (65%) y valores de proteínas plasmáticas (PT) por encima del rango de referencia.

Tabla VI: Proteínas plasmáticas de todos los pacientes en la primera visita (D0)

Paciente	Grupo	Alb g/dl D0	GlobT g/dl D0	A/G D0	PT g/dl D0
1	G1	2,56	3,43	0,75	6
2	G2	2,21	5,8	0,38	8
3	G3	1,33	4,67	0,28	6
4	G4	2,49	5,7	0,44	8,2
5	G5	2,72	3,38	0,8	6,1
6	G6	1,65	5,5	0,3	7,2
7	G7	2,34	6,57	0,4	8,8
8	G8	3,35	4,94	0,68	8,3
9	G9	1,72	9,68	0,18	11,4
10	G10	3,44	6,05	0,57	9,5
11	G11	1,19	10,2	0,12	11,4
12	G12	1,96	6,55	0,31	8,6
13	M1	3,08	2,72	1,14	5,8
14	M2	2,76	7,84	0,35	10,6
15	M3	2,18	4,62	0,47	6,8
16	M4	1,9	5,9	0,32	7,8
17	M5	1,77	8,23	0,22	10
18	M6	2,37	5,43	0,44	7,8
19	M7	2,22	4,74	0,4	7,7
20	M8	1,72	4,79	0,36	6,5

En la Tabla VII se detalla el análisis descriptivo de la electroforesis de las proteínas plasmáticas del total de los pacientes incluidos en el estudio en el momento de la primera visita (Figuras 2, 3, 4 y 5)

Tabla VII: Análisis descriptivo del proteinograma de todos los pacientes en la primera visita (D0)

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
Alb	20	2,7-4,6 g/dl	2,25	0,62	2,22	0,90	1,19	3,44
GlobT	20	2,3-5,5 g/dl	5,84	1,95	5,60	1,86	2,72	10,20
A/G	20	0,7-1,9	0,45	0,24	0,39	0,22	0,12	1,14
PT	20	5,8-7,5 g/dl	8,13	1,75	7,90	2,50	5,80	11,40

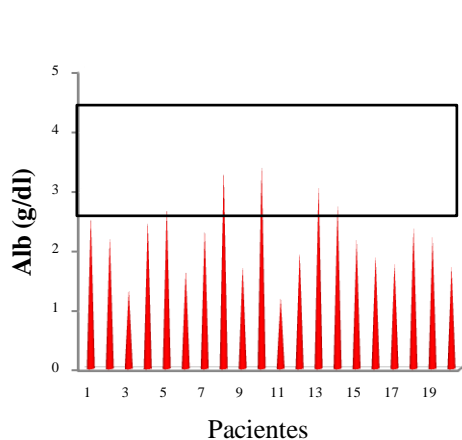


Figura 2: Albúmina (g/dl) en la primera visita (D0)

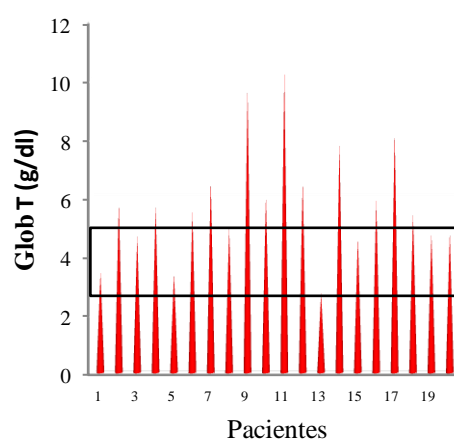


Figura 3: Globulinas Totales (g/dl) en la primera visita (D0)

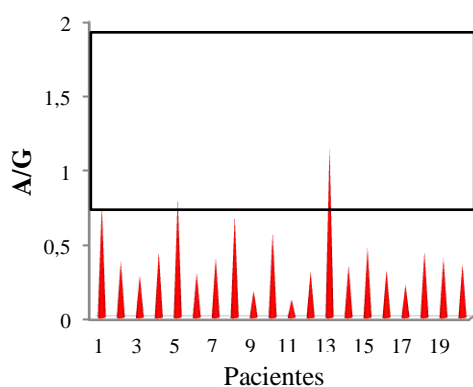


Figura 4: Cociente Albúmina/Globulinas en la primera visita (D0)

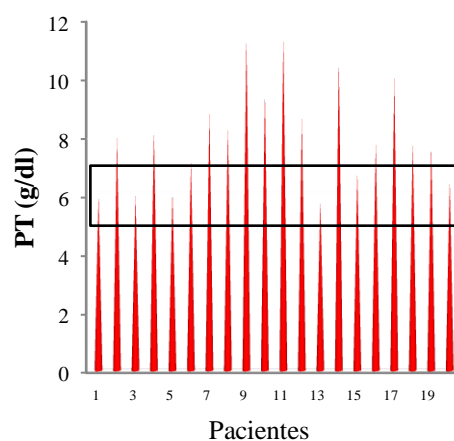


Figura 5: Proteínas Totales en la primera visita (D0)

Las cajas negras de las figuras 2, 3, 4 y 5 corresponden a los intervalos de referencia.

7.2.1.3.- Parámetros hematológicos y bioquímicos:

A.- Hemograma:

En la Tabla VII (Anexos) se detallan los resultados del hemograma para cada paciente, y en la Tabla VIII el análisis descriptivo de estos parámetros en la primera visita. En la Figuras 6, 7 y 8 se observa que 8/20 (40%) presentaron valores de Htc por debajo del rango de referencia; 4/20 (20%) presentaron un recuento de glóbulos blancos (GB) por debajo del rango de referencia y 2/18 (11%) presentaron un recuento de plaquetas por debajo del rango de referencia.

Tabla VIII: Análisis descriptivo del hemograma de todos los pacientes en la primera visita (D0)

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
Htc	20	37-55%	39,62	8,33	38,85	14,85	28,50	54
GB	20	6-17 x 10 ³ /μL	9,67	3,31	10,55	4,94	3,70	15,26
Plaquetas	18	200-500 x 10 ³ /μL	280,9	88,04	261	132	101	451

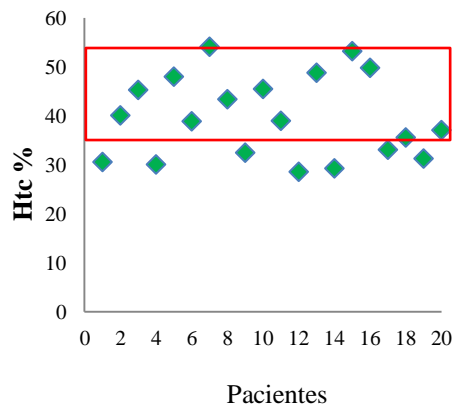


Figura 6: Hematocrito en la primera visita (D0)

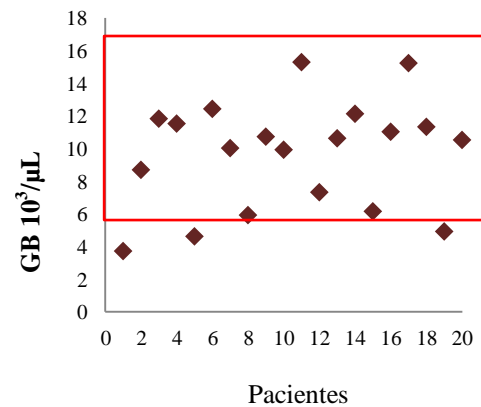


Figura 7: Glóbulos blancos en la primera visita (D0)

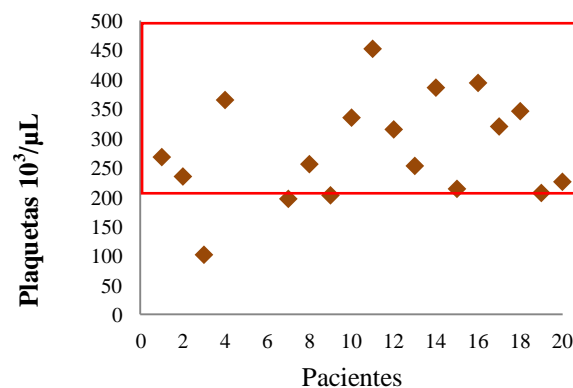


Figura 8: Recuento de plaquetas en la primera visita (D0)

Las cajas rojas de las figuras 6, 7 y 8 corresponden a los intervalos de referencia.

B.- Perfil bioquímico:

En la Tabla VIII (Anexos) se detallan los resultados del perfil bioquímico de todos los pacientes incluidos en el estudio en el momento de la primera visita. El análisis descriptivo de los parámetros valorados en el estudio bioquímico se refleja en la Tabla IX y en las Figuras 9, 10, 11 y 12. Dos perros presentaron valores de ALT por encima del rango de referencia, 4/20 (20%) presentaron valores de urea por encima del rango de referencia, 9/20 (25%) presentaron valores de calcio total (CaT) por debajo del rango de referencia y por último, 4/20 (20%) presentaron valores de fósforo inorgánico (Pinorg) por encima del rango de referencia.

Tabla IX: Análisis descriptivo de los parámetros bioquímicos de todos los pacientes en la primera visita D0

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
ALT	20	10-66 UI/L	28,65	21,72	21,50	23	9	93
Urea	20	15-75 mg/dl	49,81	30,54	39,50	38,70	19	118
CaT	20	9,1-11,7 mg/dl	9,18	0,52	9,10	0,70	8,40	10,10
Pinorg	20	3,3-5,7 mg/dl	5,17	1,88	4,35	0,95	3,80	10,80

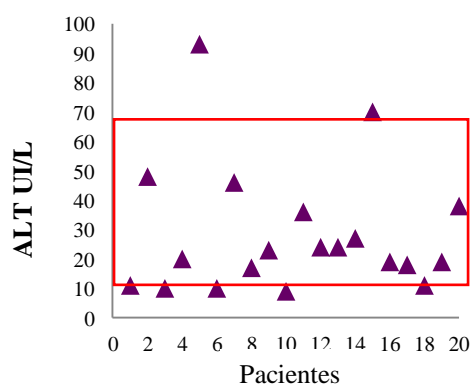


Figura 9: ALT en la primera visita (D0)

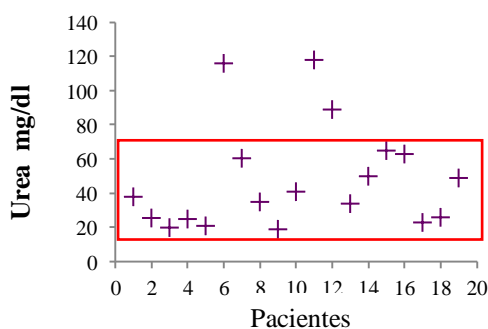


Figura 10: Urea en la primera visita (D0)

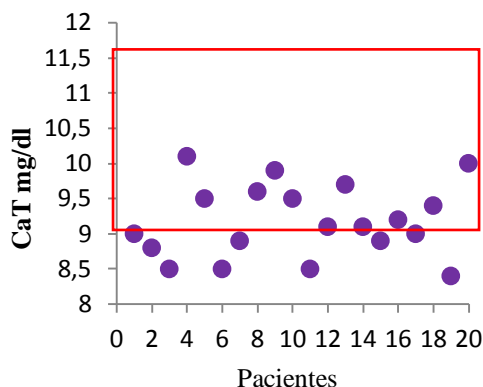


Figura 11: Calcio total en la primera visita (D0)

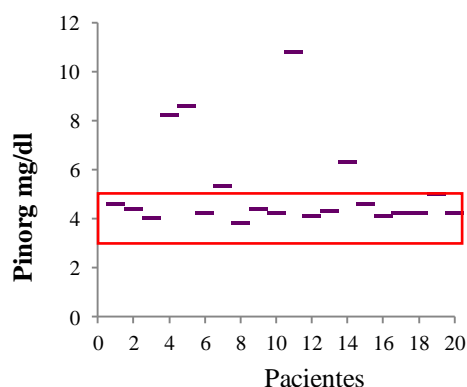


Figura 12: Fósforo inorgánico en la primera visita (D0)

Las cajas rojas de las figuras 9, 10, 11 y 12 corresponden a los intervalos de referencia.

7.2.1.4.- Parámetros de función renal:

A.- Tasa de filtración glomerular (TFG) (Figura 13):

En la Tabla IX (Anexos) se detallan los resultados de la TFG y creatinina de cada paciente incluido en el estudio. El análisis descriptivo de los valores obtenidos en el momento de la primera visita también se detalla en la Tabla X.

En relación a la TFG en la primera visita se detectó hiperfiltración (TFG >4,5 ml/kg/min) en 4/20 (20%) pacientes. También se detectó reducción de la TFG (TFG < 2ml/kg/min) en tres pacientes (15%).

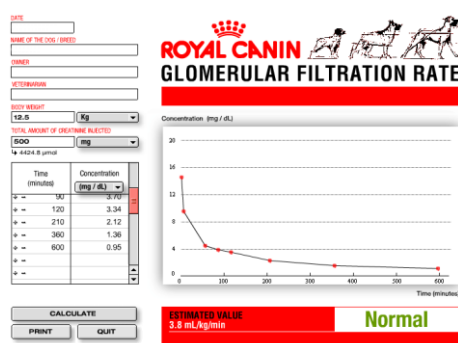


Figura 13: Determinación de la tasa de filtración glomerular mediante el aclaramiento de creatinina exógena.

B.- Creatinina:

En la primera visita del total de la población 6/20 (30%) pacientes fueron clasificados en riesgo de padecer una enfermedad renal crónica debido al hecho de padecer una enfermedad infecciosa, 11 (55%) fueron clasificados en el estadio IRIS I (creatinina < 1.4 mg/dl y proteinuria) y 3 (15%) pacientes en el estadio IRIS II (creatinina 1.4 - 2 mg/dl) (Figura 14 y 15).

Tabla X: Análisis descriptivo de la TFG y creatinina de todos los pacientes en la primera visita (D0)

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
TFG	20	2-4,5 ml/kg/min	3,50	1,63	3,35	1,60	1,50	8,70
Cr	20	0,5-1,4 mg/dl	0,92	0,41	0,70	0,65	0,50	1,85

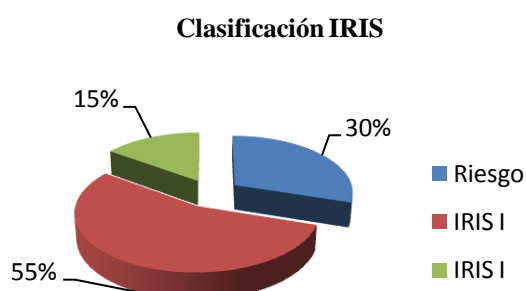


Figura 14: Clasificación IRIS en el momento D0 de los pacientes incluidos en el estudio.

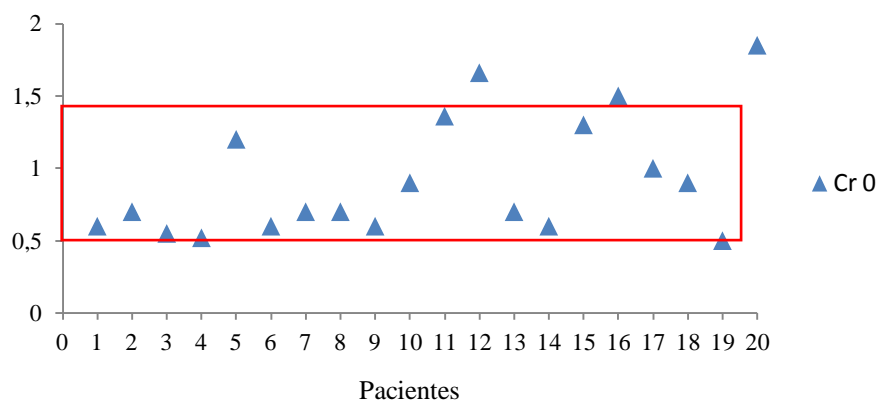


Figura 15: Creatinina en el momento D0 de los pacientes incluidos en el estudio. La caja roja corresponde al intervalo de referencia.

C.- Ratio proteína/creatinina en orina (UPC):

En la Tabla IX (Anexos) se detallan los resultados del UPC de cada paciente. El análisis descriptivo del total de los pacientes incluidos en el estudio en el momento de la primera visita se detalla en la Tabla XI. Como se puede observar en la Figura 16, más de la mitad de los pacientes, 12/20 (60%), presentaron valores de UPC por encima del valor de referencia.

Tabla XI: Análisis descriptivo del UPC de todos los pacientes en la primera visita D0

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Mín	Max
UPC	20	< 0,5	2,14	2,48	1,12	3,26	0,09	8,40

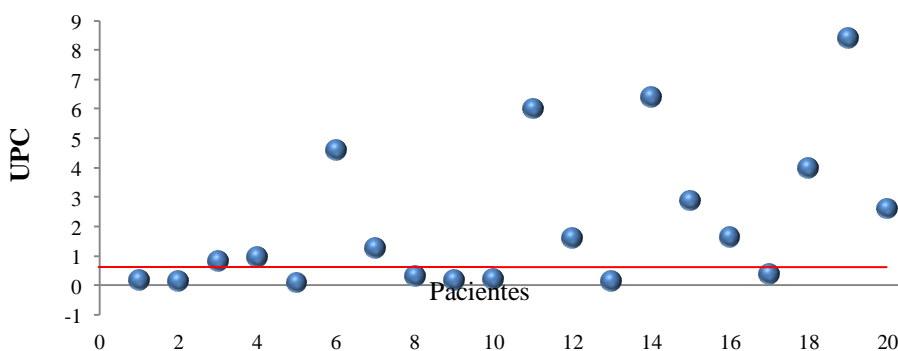


Figura 16: UPC de todos los pacientes incluidos en el estudio en la primera visita D0. La línea roja corresponde al límite de referencia.

D.- Densidad de la orina (DU):

En la Tabla IX (Anexos) se detalla la evolución de la DU de cada paciente. En la Tabla XII se muestra el análisis descriptivo de DU del total de los pacientes incluidos en el estudio en el

momento de la primera visita. El 10% de los pacientes presentaron valores de DU por debajo del límite inferior (Figura 17).

Tabla XII: Análisis descriptivo de la DU de todos los pacientes en la primera visita (D0)

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
DU	21	1.015-1.050	1027	12,03	1025	19,50	1006	1049

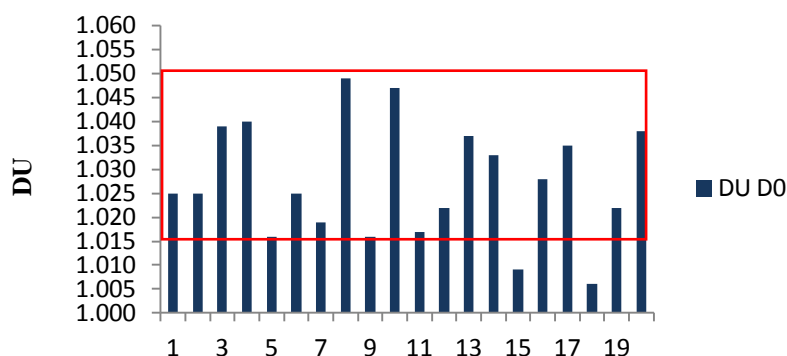


Figura 17: DU de los pacientes en la primera visita (D0). La caja roja corresponde al intervalo de referencia.

E.- Electroforesis de las proteínas urinarias (SDS- PAGE):

La separación de las proteínas urinarias en gel de poliacrilamida se realizó en 18 muestras de orina debido a que en dos de los pacientes la muestra no estaba disponibles. En la Tabla X (Anexos) se detallan los datos de densidades ópticas (D.O) de las proteínas de la orina de cada paciente. En la Tabla XIII se muestra el análisis descriptivo de la suma del porcentaje de las D.O. correspondiente a las proteínas de alto peso molecular (PAPM) y de bajo peso molecular (PBPM), del total de los pacientes incluidos en el estudio en el momento de la primera visita. Como se observa en la Figura 18 en este momento prácticamente en todos los pacientes, salvo en 1/18 (5%), más del 50 % de la D.O. correspondía a proteínas de alto peso molecular.

Tabla XIII: Análisis descriptivo de la electroforesis SDS-PAGE (D0)

Variable	N	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
% D.O. PAPM	18	66,74	16,70	66,35	17,60	22,30	99
% D.O. PBPM	18	33,23	16,73	33,65	17,60	1	77,70

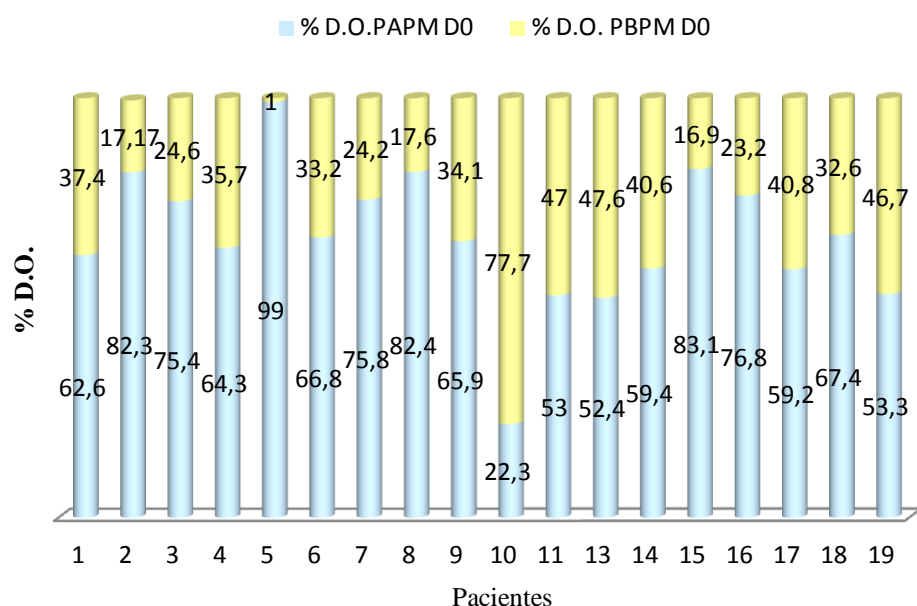


Figura 18: Porcentaje de D.O. PAPM/PBPM de las proteínas urinarias de los pacientes en la primera visita D0

7.2.1.5.- Proteínas de fase aguda (PFA):

En la Tabla XI (Anexos) se detallan los valores de las diferentes proteínas inflamatorias en cada paciente. En la tabla XIV se muestra el análisis descriptivo de las proteínas de fase aguda del total de los pacientes incluidos en el estudio en el momento de la primera visita. Como se puede observar, en el caso de la Proteína C Reactiva, el valor de la media corresponde a un incremento de 2,5 veces el valor normal mientras que la media de la Hp representa un incremento de 1,23 veces el valor normal.

Tabla XIV: Análisis descriptivo de las proteínas de fase aguda de todos los pacientes en el momento de la primera visita D0

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
Prot. CR	20	<12µg/ml	30,10	29,29	17,95	44,80	5	97,10
Hp	20	<3 g/L.	3,88	1,16	4,07	1,27	0,92	5,42
FS	20	60-190 µg/L	672,4	285,5	803,6	395,1	94,30	907
PON-1	20	3-4,3 UI/ml	3,36	0,79	3,62	1,15	1,95	4,67

A.- Proteína C reactiva (Prot. CR):

En la Figura 19 se puede observar que 11/20 pacientes (55%) presentaron valores de Prot.CR por encima del valor de referencia.

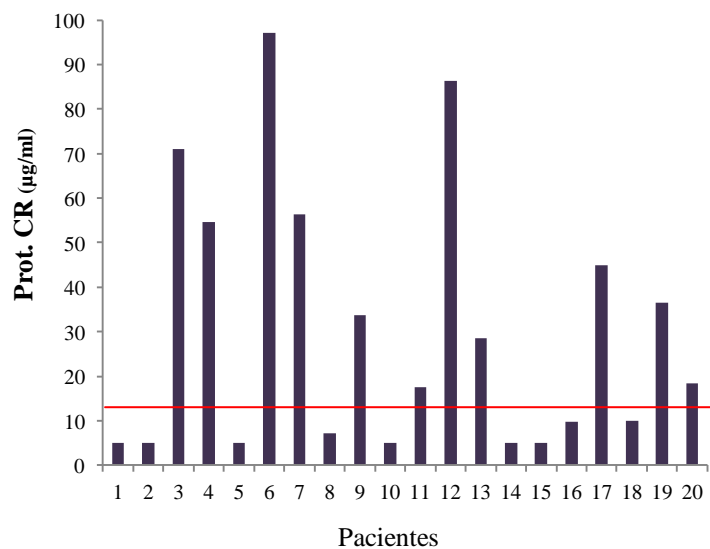


Figura 19: Proteína C Reactiva de los pacientes en la primera visita D0. La línea roja corresponde al límite de referencia.

B.- Haptoglobina (Hp):

La Figura 20 se muestra que 16/20 pacientes (80%) presentaron valores de Hp por encima del valor de referencia.

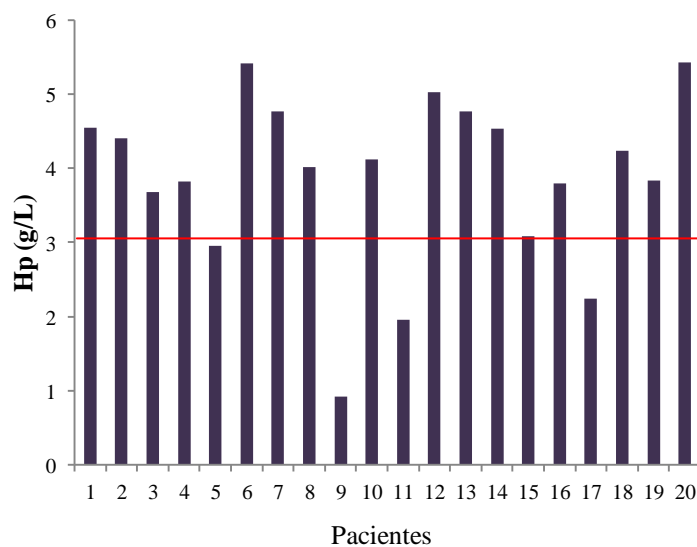


Figura 20: Haptoglobina de los pacientes en la primera visita D0. La línea roja corresponde al límite de referencia.

C.- Ferritina (FS):

En la Figura 21 se pone de manifiesto que 2/20 pacientes (10%) presentaron valores dentro del rango de referencia y 18/20 pacientes (90%) presentaron valores por encima del límite superior.

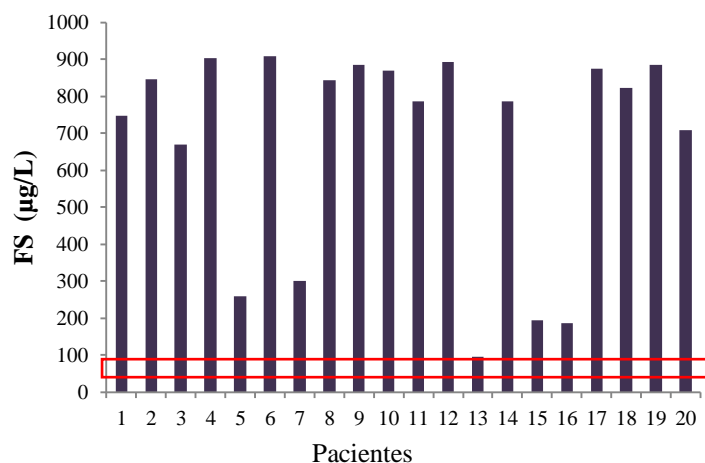


Figura 21: Ferritina de los pacientes en la primera visita D0. La caja roja corresponde al intervalo de referencia.

D.- Paraoxonasa-1 (PON-1):

En la Figura 22 se detalla que 11/20 pacientes (50%) presentaron valores dentro del rango de referencia, 2/20 (10%) presentaron valores por encima del límite superior y 7/20 (35%) por debajo del límite inferior.

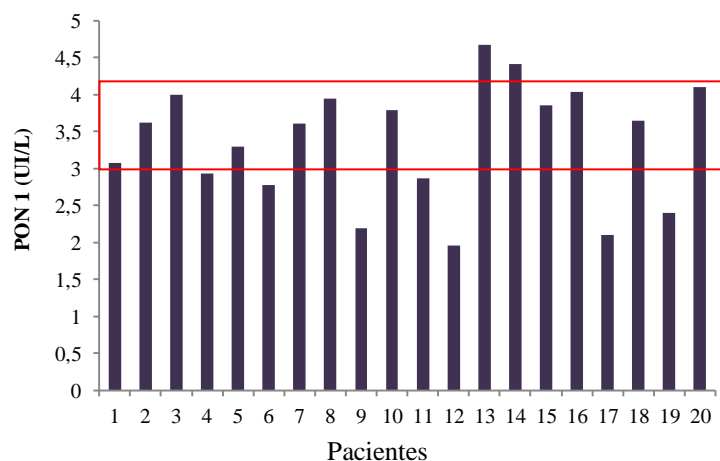


Figura 22: PON-1 de los pacientes en la primera visita D0. La caja roja corresponde al intervalo de referencia.

7.2.2.- ANALISIS DESCRIPTIVO DEL GRUPO G el Día 0, Día 30 y Día 90 (D0, D30 y D90):

7.2.2.1.- Parámetros clínicos:

A.- Puntuación clínica (PC):

En las Tablas XV se detalla la puntuación clínica de cada paciente del Grupo G en las tres visitas. En la Tabla XVI se muestra el análisis descriptivo de la puntuación clínica de los pacientes del grupo G en las tres visitas (D0, D30, D90), observándose una reducción de la misma a lo largo del tiempo. Los pacientes G1, G2, G5 y G9 no presentaron ningún signo clínico el Día 90, al final del estudio. La reducción de la PC pone de manifiesto la mejoría clínica de los pacientes (Figura 23).

Tabla XV: Evolución de la puntuación clínica a lo largo de las visitas D0, D30 y D90, de cada uno de los pacientes incluidos en el Grupo G

Grupo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
PC D0	7	8	6	12	2	10	9	12	2	6	14	10
PC D30	4	0	2	13	0	17	3	2	0	2	10	4
PC D90	0	0	2	3	2	3	3	1	0	2	3	3

Tabla XVI: Análisis descriptivo de la puntuación clínica por tiempos D0, D30 y D90. Grupo G

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
PC D0	12	37/37	8,17	3,79	8,50	5	2	14
PC D30	12		4,75	5,56	2,50	6	0	17
PC D90	12		1,67	1,37	2	3	0	3

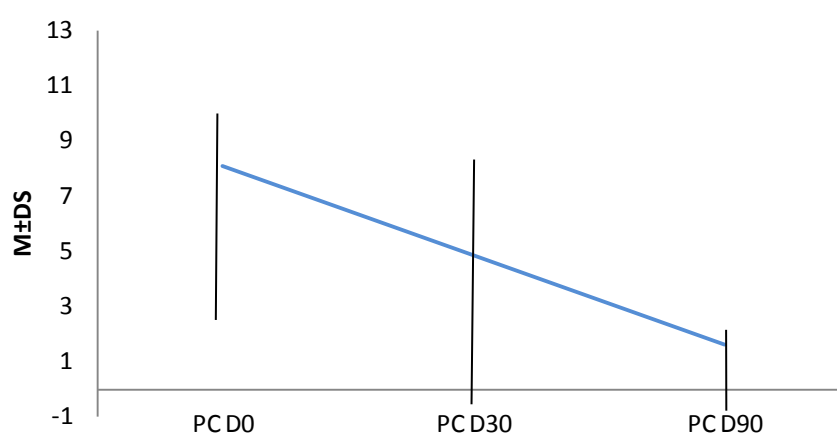


Figura 23: Puntuación clínica (PC) (M ± DS) de los pacientes del Grupo G a lo largo de las tres visitas D0, D30 y D90.

B.- Peso:

En la Tabla V (Anexos) se detalla la evolución del peso de cada paciente a lo largo de las tres visitas. En la Tabla XVII se muestra el análisis descriptivo del peso de los pacientes del grupo G en las tres visitas, observándose un incremento del mismo a lo largo del tiempo (Figura 24).

Tabla XVII: Análisis descriptivo del peso por tiempos D0, D30 y D90. Grupo G

Variable	N	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
Peso D0	12	21,52	8,69	8,95	15,10	10,40	34,60
Peso D30	11	22,17	8,42	19,00	12,00	11,30	36,60
Peso D90	12	24,65	10,56	21,85	18,10	12,50	41,50

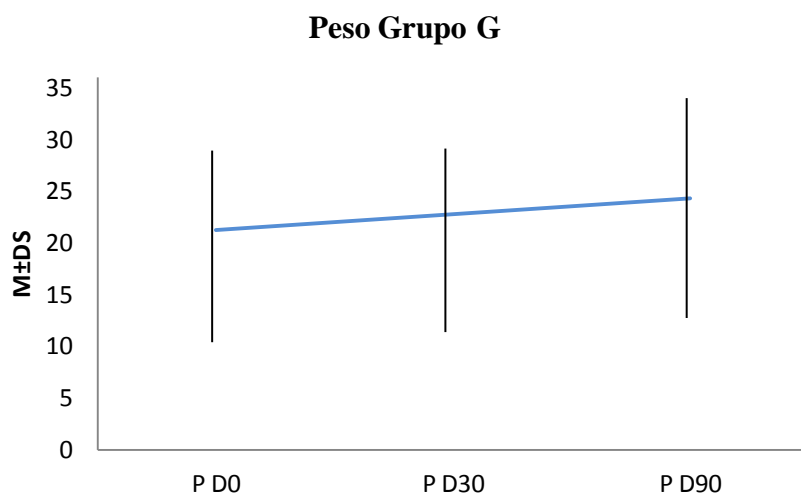


Figura 24: Peso de los pacientes del Grupo G a lo largo de las tres visitas D0, D30 y D90 (M±DS)

C.- Presión arterial sistólica (PAS):

En la Tabla XVIII se muestran los datos de PAS de cada paciente a lo largo de las tres visitas. En la primera visita 5/11 pacientes (45,45%) (G1, G2, G3, G11 y G12) presentaron la PAS por encima del límite superior. Al final del tratamiento (D30), 5/12 pacientes (41,6%) (G1, G4, G6, G8 y G11) presentaron la PAS por encima del límite y en al final del estudio (D90) 4/12 (33,3%) pacientes (G3, G5, G8 y G11) presentaron la PAS por encima del límite superior.

Tabla XVIII: Presiones arteriales sistólicas de cada paciente a lo largo de las tres visitas D0, D30 y D90 (sd sin determinar).

Paciente	PAS mmHg D0	PAS mmHg D30	PAS mmHg D90
G1	240	221	111
G2	152	130	143
G3	240	140	190
G4	134	188	138
G5	sd	125	155
G6	141	151	139
G7	139	121	119
G8	134	154	154
G9	124	123	113
G10	136	134	123
G11	164	158	151
G12	156	134	113

En la Tabla XIX se muestra el análisis descriptivo de la presión arterial sistólica de los pacientes del grupo G en las tres visitas, observándose en general una reducción de la misma a lo largo del tiempo

Tabla XIX: Análisis descriptivo de las presiones arteriales sistólicas por tiempos D0, D30, D90. Grupo G

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
PAS D0	11	<150 mmHg	160,0	41,14	141,0	30,0	124,0	240,0
PAS D30	12		148,3	29,75	137,0	28,50	121,0	221,0
PAS D90	12		137,4	23,36	138,5	36,50	111,0	190,0

7.2.2.2.- Resultados del diagnóstico parasitológico e inmunológico

A.- PCR:

En la Tabla XX se detalla la evolución de la citología y la PCR de cada paciente a lo largo de las visitas D0 y D90.

Tabla XX. Citología médula ósea, PCR anidada de médula ósea y orina, qPCR (PCR cuantitativa a tiempo real) de médula/ganglio en D0 a D90 (POS positivo, NEG negativo, sd sin determinar)

Paciente	Médula ósea						Linfonodo				Orina	
	Citología		PCR nested		qPCR		PCR nested		qPCR a		PCR nested	
	D0	D90	D0	D90	D0	D90	D0	D90	D0	D90	D0	D90
G1	POS	sd	POS	sd	0	sd	sd	sd	sd	sd	NEG	NEG
G2	POS	POS	POS	POS	0,07	0,1	sd	sd	sd	sd	NEG	NEG
G3	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd
G4	POS	NEG	NEG	POS	sd	0,03	sd	sd	sd	sd	NEG	NEG
G5	POS	POS	NEG	NEG	sd	sd	sd	sd	sd	sd	NEG	NEG
G6	POS	POS	POS	POS	0	0,018	sd	sd	sd	sd	NEG	NEG
G7	NEG	NEG	POS	POS	3,143	0,003	sd	sd	sd	sd	NEG	NEG
G8	POS	NEG	POS	NEG	0,008	sd	sd	sd	sd	sd	NEG	NEG
G9	POS	POS	sd	NEG	sd	sd	POS	sd	40,36	sd	NEG	NEG
G10	NEG	sd	sd	sd	sd	sd	POS	sd	0,871	sd	NEG	NEG
G11	NEG	NEG	POS	POS	0,02	0,001	sd	sd	sd	sd	NEG	NEG
G12	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd

B.- IFI y proteinograma:

En la Tabla VI (Anexos) se puede observar la evolución de la titulación de anticuerpos de cada paciente entre la primera visita y la última revisión (D0-D90). En el Grupo G, 8/12 (66,6%) se redujo la IFI en dos títulos, lo cual se considera indicativo de mejoría. También en la Tabla VI (Anexos) se puede observar la evolución de las proteínas plasmáticas de cada paciente.

En la Tabla XXI se muestra el análisis descriptivo del proteinograma de los pacientes del Grupo G en las tres visitas D0, D30 y D90.

En un primer momento (D0) 9/12 pacientes (75%) presentaron hipoalbuminemia; 7/12 (58,3%) hiperglobulinemia, 10/12 (83,3%) reducción del ratio A/G y 8/12 (6,6%) hiperproteinemia (Figuras 25, 26, 27 y 28).

Terminado el tratamiento (D30) 5/12 pacientes (41,6%) presentaron hipoalbuminemia, 3/12 (25%) hiperglobulinemia y 6/12 (50%) reducción del ratio A/G y 4/12 (33,3%) hiperproteinemia (Figuras 25, 26, 27 y 28).

En la última revisión (D90) 3/12 pacientes (25%) (G4, G6 y G11) presentaron hipoalbuminemia, 2/12 (16,6%) (G11 y G12) hiperglobulinemia y 4/12 (33,3%) (G4, G6, G11 y G12) reducción del ratio A/G y 4/12 (33,3%) (G3, G8, G11 y G12) hiperproteinemia (25, 26, 27 y 28).

Tabla XXI: Análisis descriptivo del proteinograma por tiempos D0, D30 y D90. Grupo G

Variable	N	Intervalo de referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
Alb D0	12	2,7-4,6 g/dl	2,25	0,72	2,28	0,96	1,19	3,44
Alb D30	12		2,76	0,71	2,91	1,09	1,45	3,56
Alb D90	12		3,38	0,89	3,75	1,33	1,61	4,64
GlobT D0	12	2,3-5,5 g/dl	6,04	2,10	5,75	1,76	3,38	10,20
GlobT D30	12		4,45	1,56	3,97	1,30	2,64	8,44
GlobT D90	12		4,01	1,58	3,62	1,21	2,53	8,19
A/G D0	12	0,7-1,9 g/dl	0,43	0,22	0,39	0,34	0,12	0,80
A/G D30	12		0,69	0,29	0,72	0,39	0,15	1,27
A/G D90	12		0,98	0,43	1,09	0,72	0,20	1,61
PT D0	12	5,8-7,5 g/dl	8,29	1,85	8,25	2,50	6,00	11,40
PT D30	12		7,29	1,52	7,20	1,50	5,20	10,90
PT D90	12		7,39	1,05	6,90	1,35	6,20	9,80

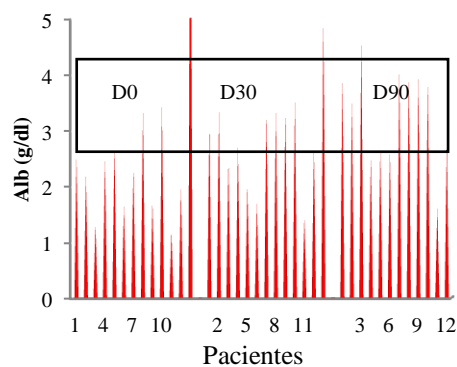


Figura 25: Evolución de la Albúmina en el Grupo G a lo largo de las tres visitas.

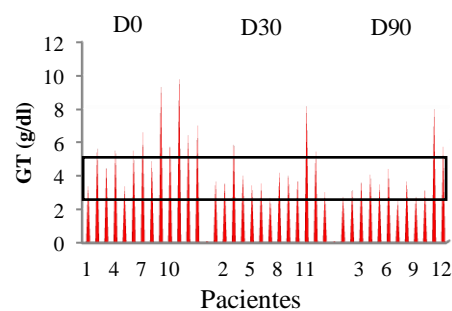


Figura 26: Evolución de las Globulinas Totales en el Grupo G a lo largo de las tres visitas

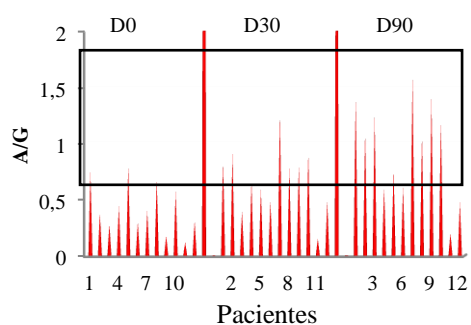


Figura 27: Evolución del ratio A/G en el Grupo G a lo largo de las tres visitas

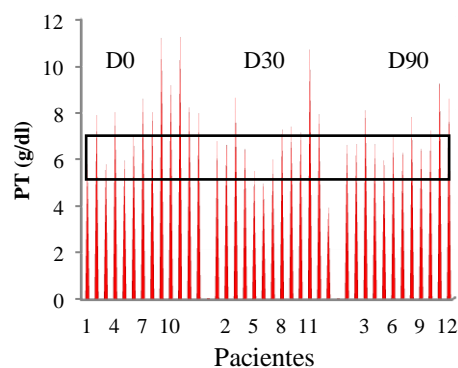


Figura 28: Evolución de las Proteína Totales en el Grupo G a lo largo de las tres visitas

Figuras 25, 26, 27 y 28 la caja negra corresponde al intervalo de referencia.

7.2.2.3.- Parámetros hematológicos y bioquímicos:

A.- Hemograma:

En la Tabla VII (Anexos) se muestra la evolución de los parámetros del hemograma de cada paciente a lo largo de las tres visitas. En la Tabla XXII se muestra el análisis descriptivo de los parámetros valorados en el hemograma, de los pacientes del Grupo G en las tres visitas.

En la primera visita (D0) 4/12 pacientes (33,3%) presentaron valores de Htc por debajo del rango de referencia; 2/10 (20%) (G3 y G 7) valores de plaquetas por debajo del rango de referencia y 3/12 (25%) (G1, G5, y G8) valores de GB por debajo del rango de referencia. (Figuras 29, 30 y 31).

Al final del tratamiento 1/12 paciente (8,3 %) (G6) presentó valores de Htc por debajo del rango de referencia, 1/10 (10%) (G7) valores de plaquetas por debajo del rango de referencia y en 1/12 (8,3 %) (G2) valores de GB por debajo del rango de referencia (Figuras 29, 30 y 31).

Tabla XXII: Análisis descriptivo del hemograma por tiempos D0 y D90. Grupo G

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
Htc D0	12	37-55%	39,58	8,01	39,45	13,85	28,50	54
Htc D90	12		46,54	7,23	48,40	10,33	34,90	58,80
GB D0	12	6-17 x 10 ³ /μL	9,31	3,42	9,95	5,05	3,70	15,26
GB D90	12		9,94	3,84	9,05	2,15	5,40	18,7
Plaquetas D0	10	200-500 x 10 ³ /μL	271,8	98,76	261	132	101	451
Plaquetas D90	10		313,7	94,53	344,5	143	198	444

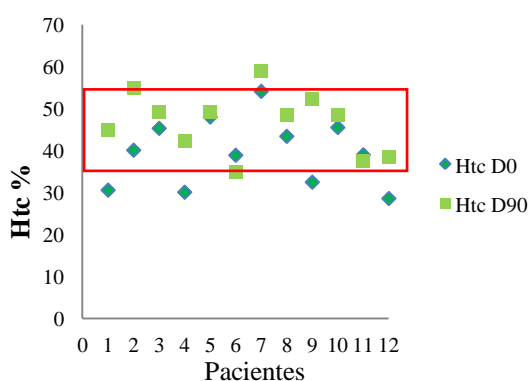


Figura 29: Evolución del Htc en el Grupo G desde D0 a D90

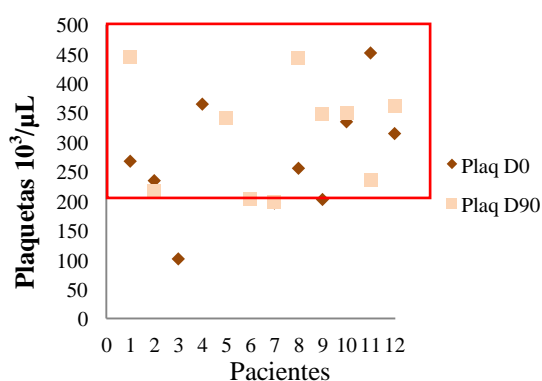


Figura 30: Evolución de las plaquetas en el Grupo G desde D0 a D90

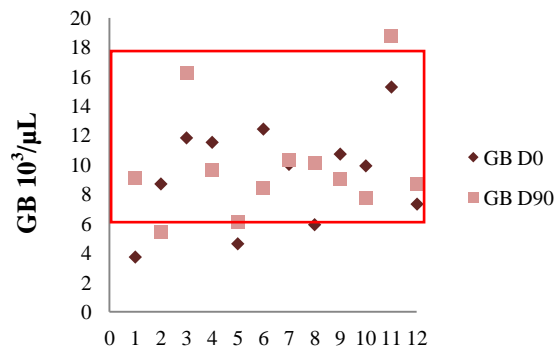


Figura 31: Evolución de los GB en el Grupo G desde D0 a D90

Figuras 29, 30 y 31 la caja roja corresponde al intervalo de referencia.

B.- Perfil bioquímico:

En la Tabla VIII (Anexos) se muestra la evolución de los parámetros valorados en el perfil bioquímico para cada paciente a lo largo de las tres visitas. En la Tabla XXIII se muestra el análisis del estudio bioquímico en D0 y D90.

En D0 y D90, 1/12 (8,3%) (G5) y 3/12 (25%) (G3, G4 y G5) presentaron respectivamente valores de ALT por encima del límite superior (Figura 32).

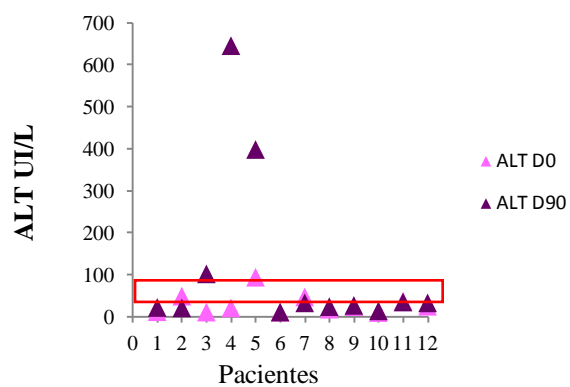
En D0 y D90, 4/12 (33,3%) y 2/12 (16,6%) (G11 Y G12) presentaron respectivamente valores de urea por encima del límite superior (Figura 33).

En D0 y D90, 6/12 (50%) (G1, G2, G3, G7 y G11) y 2/12 (16,6%) (G2 y G11) presentaron respectivamente valores de Ca total por debajo del límite de referencia (Figura 34).

En D0, 3/12 (25%) (G4, G5 y G11) presentaron valores de Pinorg por encima del límite de referencia (Figura 35).

Tabla XXIII: Análisis descriptivo de los parámetros bioquímicos por tiempos D0 y D90. Grupo G

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
ALT D0	12	10-66 UI/L	28,92	24,36	21,50	30,50	9	93
ALT D90	12		112,8	199	29	47	10	644
Urea D0	12	15-57 mg/dl	50,68	36,90	36,50	38,70	19	118
Urea D90	12		38,25	32,09	26,50	21	17	130
CaT D0	12	9,1-11,7 mg/dl	9,16	0,56	9,05	0,90	8,50	10,10
CaT D90	12		9,33	0,59	9,35	0,65	7,90	10
Pinorg D0	12	3,3-5,7 mg/dl	5,55	2,31	4,40	2,60	3,80	10,80
Pinorg D90	12		4,10	0,61	4,20	0,40	2,60	5,10



Figuras 32: Evolución de la ALT en el Grupo G desde D0 a D90

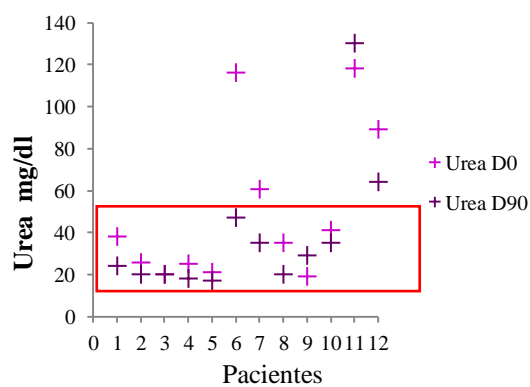


Figura 33: Evolución de la Urea en el Grupo G desde D0 a D90

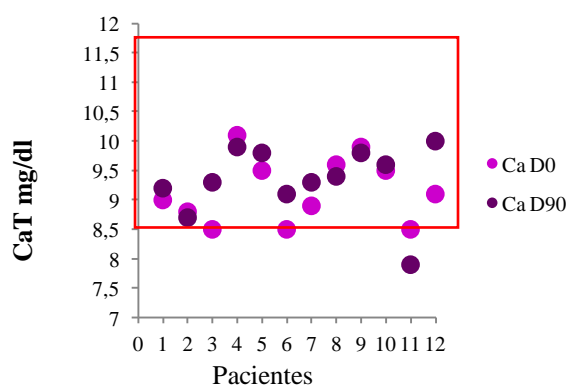


Figura 33: Evolución de la Calcio total en el Grupo G desde D0 a D90

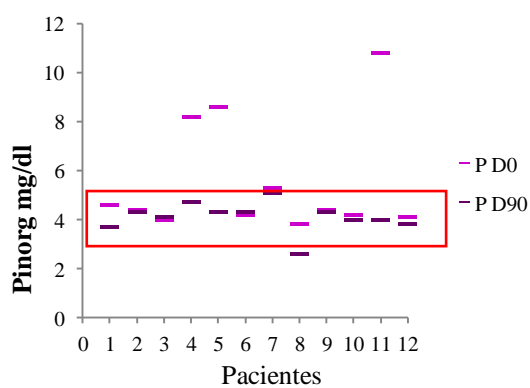


Figura 34: Evolución de la Fósforo inorgánico en el Grupo G desde D0 a D90

Figuras 32, 33, 34 y 35 la caja roja corresponde al intervalo de referencia.

7.2.2.4.- Parámetros de función renal:

A.- Tasa de filtración glomerular (TFG) y creatinina:

En la Tabla IX (Anexos) se muestran los datos correspondientes a la TFG y a la creatinina de cada paciente a lo largo del tiempo. En la Tabla XXIV se muestra el análisis descriptivo de los parámetros bioquímicos renales, de los pacientes del Grupo G en las diferentes visitas.

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
TFG D0	12	2-4,5 ml/kg/min	3,91	1,82	3,55	1,40	1,50	8,70
TFG D90	12		3,62	2,01	3,40	1,05	1,50	9,40
Cr D0	12	0.5-1.4 mg/dl	0,84	0,37	0,70	0,45	0,52	1,66
Cr D30	12		1,03	0,54	0,90	0,45	0,50	2,40
Cr D90	12		0,92	0,40	0,78	0,36	0,50	1,82

Tabla XXIV: Análisis descriptivo de la TFG y de la creatinina plasmática en las diferentes visitas Grupo G

En la Figura 36 se representa el aclaramiento de creatinina exógena de los pacientes del Grupo G en la primera visita (D0). Todos los pacientes tuvieron TFG dentro del rango de referencia a excepción de tres pacientes que presentaron hiperfiltración 3/12 (25%) (G3, G4 y G9) y 1/12 el paciente G12 con una tasa de filtración por debajo del límite inferior.

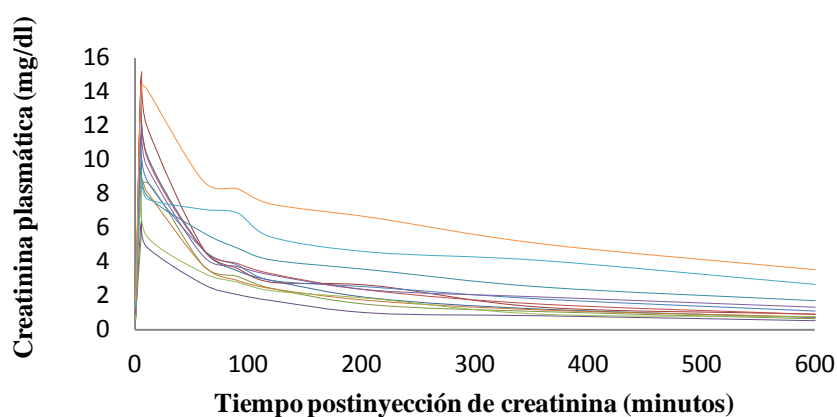


Figura 36: Aclaramiento de creatinina exógena grupo G D0

En la Figura 37 se representa el aclaramiento de creatinina exógena de los pacientes del Grupo G en la última visita (D90). Un paciente presentó hiperfiltración (G6) y 2/12 (16,6%) (G11 y G12) una tasa de filtración por debajo del límite inferior.

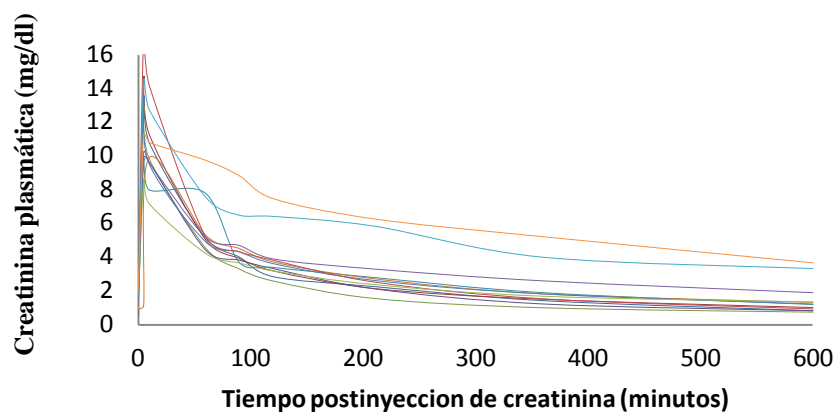


Figura 37: Aclaramiento de creatinina exógena grupo G D90

En la figura 38 se representa la evolución de la creatinina plasmáticas en los pacientes del Grupo G a lo largo de las tres visitas.

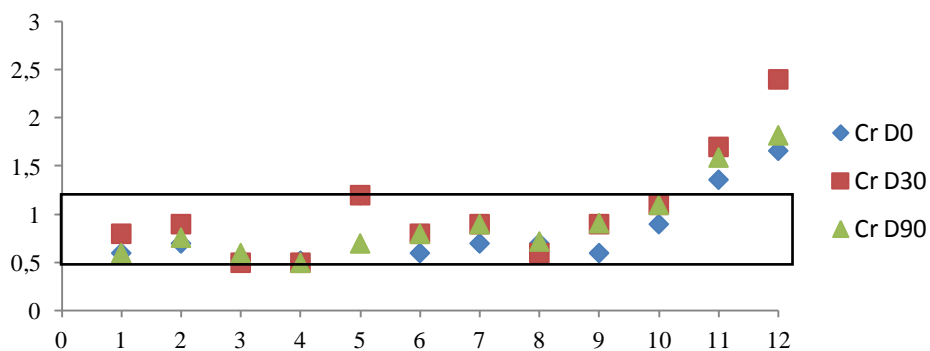


Figura 38: Evolución de la Creatinina en el Grupo G a lo largo del tiempo (D0, D30 y D90). La caja negra representa el rango de referencia.

B.- Ratio proteína/ creatinina en orina (UPC):

En la Tabla XXV se muestra los datos de UPC de los pacientes del Grupo G. Aunque se observó una reducción a lo largo del tiempo, 3/5 pacientes (60%) (G3 G6 y G12) que presentaban inicialmente proteinuria, siguieron manteniéndose dentro del rango proteinúrico al final del estudio. En la tabla XXVI se muestra el análisis descriptivo del UPC, de los pacientes del Grupo G en las tres visitas.

Tabla XXV: Evolución de la proteinuria a lo largo del tiempo D0, D30 y D90. Grupo G (NP: No proteinúrico, BP: Borderline proteinúrico, P: proteinúrico)

Paciente	UPC D0	UPC D30	UPC D90	UPC D0	UPC D30	UPC D90
G1	0,16	0,09	0,1	NP	NP	NP
G2	0,14	0,1	0,12	NP	NP	NP
G3	0,83	0,8	1	P	P	P
G4	0,96	0,32	0,3	P	BP	BP
G5	0,09	0,07	0,07	NP	NP	NP
G6	4,6	7,46	2,7	P	P	P
G7	1,28	0,6	0,08	P	P	NP
G8	0,3	0,13	0,25	BP	NP	BP
G9	0,17	0,08	0,1	NP	NP	NP
G10	0,21	0,07	0,07	BP	NP	NP
G11	6	3,9	4,7	P	P	P

Tabla XXVI: Análisis descriptivo del UPC por tiempos D0, D30 y D90. Grupo G

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
UPC D0	11	<0.5	1,34	2,02	0,30	1,12	0,09	6
UPC D30	11		1,24	2,35	0,13	0,72	0,07	7,46
UPC D90	11		0,86	1,50	0,12	0,92	0,07	4,70

C.- Densidad de la orina (DU):

En la Tabla IX (Anexo) se detalla la evolución de la DU de cada paciente a lo largo del tiempo. En la tabla XXVII se muestra el análisis descriptivo de DU del Grupo G en las tres visitas. En la Figura 39 se puede observar que en la primera visita, 3/12 pacientes (25%) (G5, G9 y G11) mostraron densidades urinarias próximas al límite inferior normal; al final del tratamiento, 3/12 pacientes (25%) (G1, G10 y G12) mostraron densidades próximas al límite inferior normal y en el último control, 2/12 (16,6%) (G11 y G12) mostraron orinas con densidades próximas al límite inferior normal.

Tabla XXVII: Análisis descriptivo de la DU por tiempos D0, D30 y D90. Grupo G

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
DU D0	12	1,015-1,050	1028	12,13	1.025	21,50	1.016	1.049
DU D30	12		1023	7,60	1.021	7	1.015	1.040
DU D90	12		1029	8,70	1.031	14	1.015	1.041

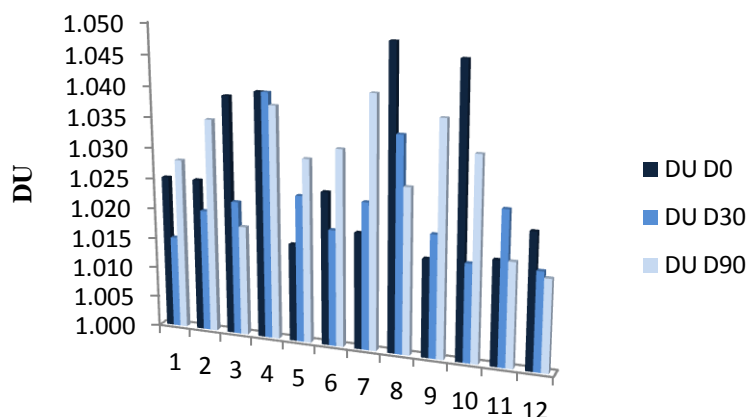


Figura 39: Evolución de la DU en el grupo G a lo largo de las tres visitas

D.- Electroforesis de proteínas en orina (SDS- PAGE):

En la Tabla X (Anexos) se muestra la evolución de la electroforesis SDS-PAGE de las proteínas de la orina en cada paciente a lo largo de las tres visitas. En la Tabla XXVIII se detalla el análisis descriptivo de la suma del porcentaje de las densidades ópticas (D.O.) correspondiente a las proteínas de alto peso molecular (PAPM) y de bajo peso molecular (PBPM), en el Grupo G a lo largo del tiempo. Se observó un aumento del porcentaje D.O. PAPM del tiempo 0 al 30 y posterior reducción del tiempo 30 al 90. El efecto contrario se observó del porcentaje en la D.O. PBPM (Figuras 40 y 41)

Tabla XXVIII: Análisis descriptivo de la D.O. de las fracciones de proteínas en orina por tiempos D0, D30 y D90. Grupo G

Variable	N	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
% D.O. PAPM D0	11	68,16	19,62	66,8	19,7	22,3	99
% D.O. PAPM D30	11	84,75	9,44	86,8	13,8	66,3	96,3
% D.O. PAPM D90	10	71,43	16,63	78,55	31,5	43,8	87,9
% D.O. PBPM D0	11	31,79	19,66	33,2	19,8	1	77,7
% D.O. PBPM D30	11	15,25	9,44	13,2	13,8	3,7	33,7
% D.O. PBPM D90	10	28,57	16,63	21,45	31,5	12,1	56,2

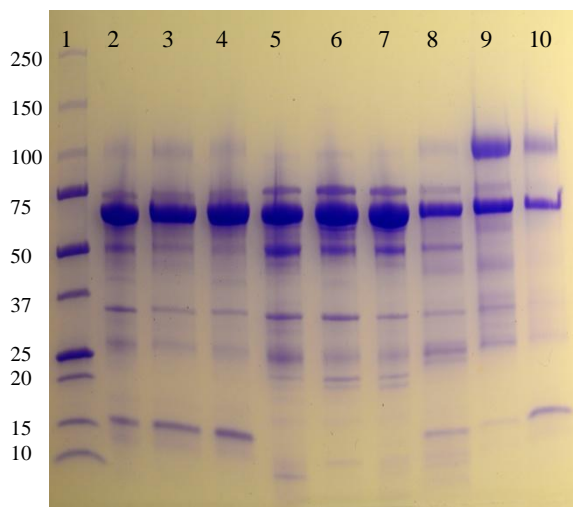


Fig. 40: Electroforesis de proteínas de la orina SDS-Page. Tinción Azul Coomassie. Grupo G.

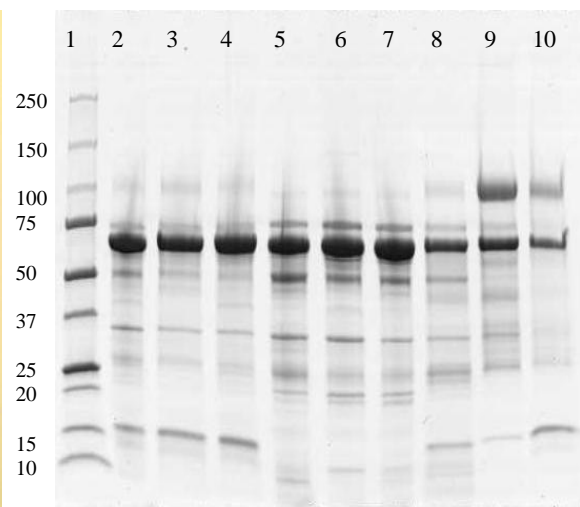


Fig. 41: Electroforesis de proteínas de la orina SDS-Page. Lectura mediante densitometría. Grupo G.

Fig.40: Electroforesis de proteínas urinarias en SDS-PAGE tinción con azul Coomassie. Calle 1 marcadores de peso molecular. En las siguientes calles tres muestras consecutivas (D0, D30 y D90) de tres pacientes diferentes (G3, G6 y G4). En la línea vertical de la izquierda de la imagen se muestran los pesos moleculares del marcador en kDa. Fig 41: Misma imagen que la anterior leída mediante densitometría

En las Figuras 42, 43 y 44 se representan esquemáticamente la variación en los porcentajes de D.O. a lo largo del tiempo

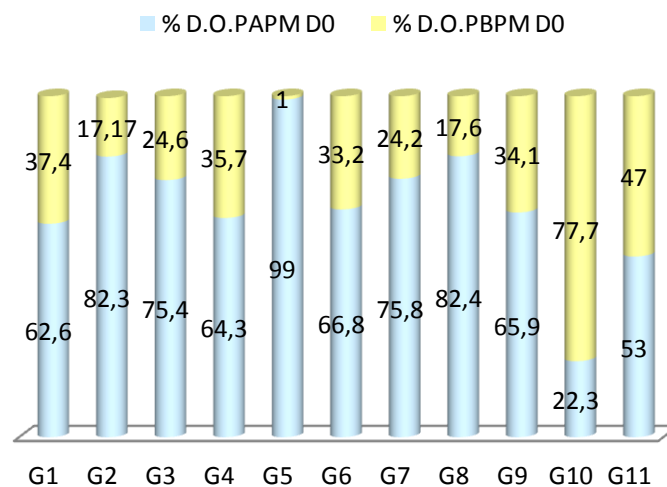


Figura 42: porcentaje de D.O. en el Grupo G en el momento D0

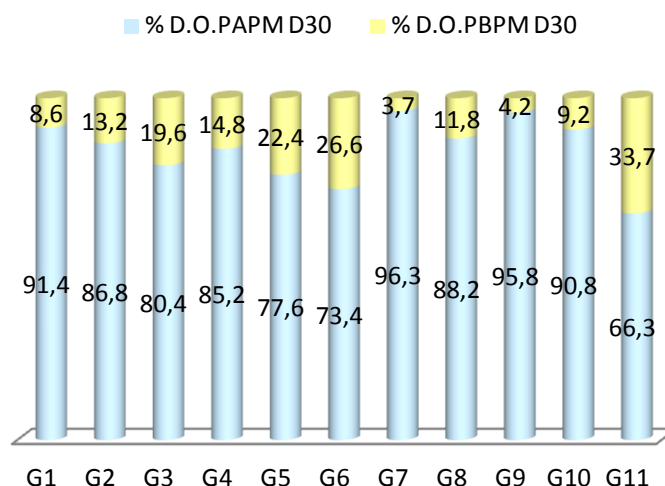


Figura 43: porcentaje de D.O. en el Grupo G en el momento D30

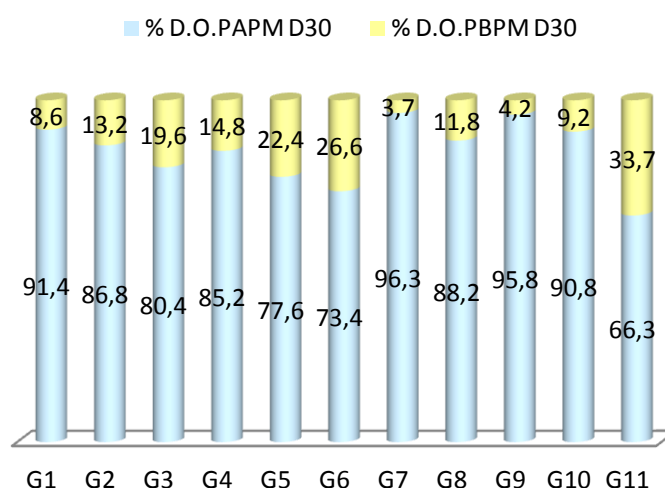


Figura 44: porcentaje de D.O. en el Grupo G en el momento D90

7.2.2.5.- Proteínas de fase aguda (PFA):

En la Tabla XI (Anexos) se detalla la evolución de las distintas PFA de cada paciente a lo largo del tiempo. En la Tabla XXIX se muestra el análisis descriptivo de las PFA en el grupo G a lo largo del tiempo. Se observó una reducción de la Prot.CR, de la Hp y de la FS, y un aumento del PON-1.

Tabla XXIX: Análisis descriptivo de las proteínas de fase aguda por tiempos D0, D30 y D90. Grupo G

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
Prot.CR D0	12	<12 µg/ml	37	34,71	25,65	58,65	5	97,1
Prot.CR D30	10		6,66	3,85	5	0	5	16,70
Prot.CR D90	12		7,39	5,93	5	0	5	24
Hp D0	12	<3g/L	3,80	1,30	4,07	1,33	0,92	5,41
Hp D30	10		3,73	1,39	3,71	1,55	0,65	5,53
Hp D90	12		3,45	1,55	3,73	1,47	0,1	5,69
FS D0	12	60-190 µg/L	741,8	227,4	843,6	179,8	258,5	907
FS D30	10		288,5	102,5	260,6	62,7	172,6	545,1
FS D90	12		243,1	61,54	234,1	92,6	173,4	347,5
PON-1 D0	12	3-4.3 UI/L	3,17	0,66	3,18	0,89	1,95	4
PON-1 D30	10		4,32	0,83	4,28	1,21	3,03	5,81
PON-1 D90	12		4,47	0,87	4,33	1,42	3,32	5,91

A.-Proteína C Reactiva (Prot. CR) (Figura 45):

En la primera visita (D0) 7/12 pacientes (58,3%) presentaron valores de Prot.CR por encima del límite de referencia.

Al final del tratamiento (D30) el paciente G6 presentó valores de Prot.CR por encima del límite de referencia.

En el último control (D90) 2/12 pacientes (16,6%) (G4 y G6) presentaron valores de Prot.CR por encima del límite de referencia.

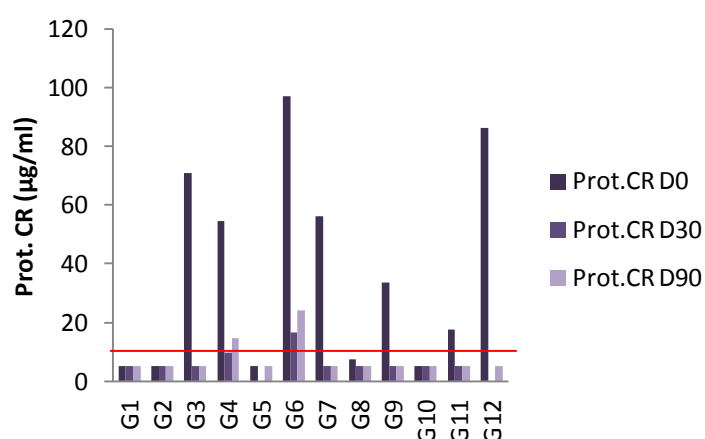


Figura 45: Evolución de la Prot. C Reactiva en el Grupo G a lo largo de las tres visitas. La línea roja corresponde al límite de referencia.

B.- Haptoglobina (Hp) (Figura 46):

En la primera visita (D0) 9/12 pacientes (75%) presentaron valores de Hp por encima del límite de referencia.

Al final del tratamiento (D30) 8/10 pacientes (80%) presentaron valores de Hp por encima del límite de referencia.

En el último chequeo (D90) 9/12 pacientes (75%) presentaron valores de Hp por encima del límite de referencia.

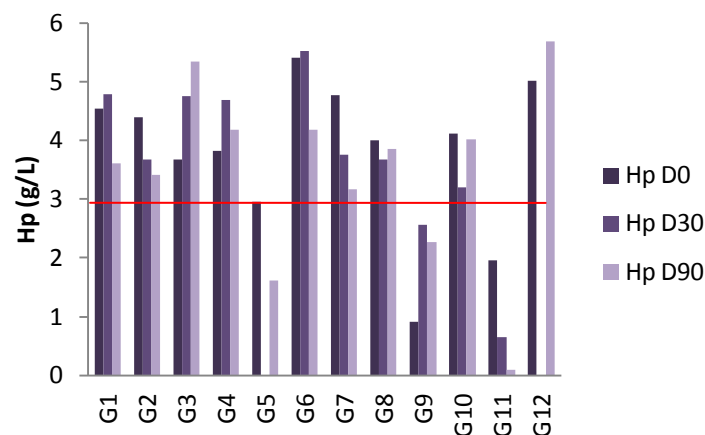


Figura 46: Evolución de la Hp en el Grupo G a lo largo de las tres visitas. La línea roja corresponde al límite de referencia.

C.- Ferritina (FS) (Figura 47):

En la primera visita (D0) todos los perros presentaron valores de FS por encima del límite de referencia.

Al finalizar el tratamiento (D30) 9/10 pacientes (90%) seguían presentando valores de FS por encima del límite de referencia y 1/10 (10%) (G8) dentro del rango de referencia.

En el último control (D90) 9/12 pacientes (75%) (G1, G2, G3, G4, G6, G8, G10 y G12) presentaron valores de FS por encima del límite de referencia y 2/12 (16,6%) (G7 y G8) dentro del rango de referencia

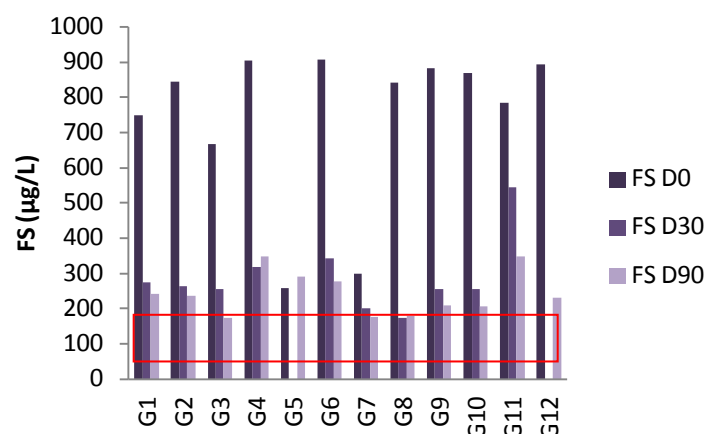


Figura 47: Evolución de la FS en el Grupo G a lo largo de las tres visitas. La caja roja corresponde al intervalo de referencia.

D.- Paraoxonasa-1 (PON-1) (Figura 48):

En un primer momento (D0) 5/12 pacientes (41,6%) presentaron valores de PON-1 por debajo del límite de referencia y 7/12 (58,3%) valores dentro del rango.

Al final del tratamiento (D30) 5 pacientes presentaron valores por encima del límite de referencia.

En el último control (D90) 6/12 (50%) presentaron valores por encima del límite de referencia.

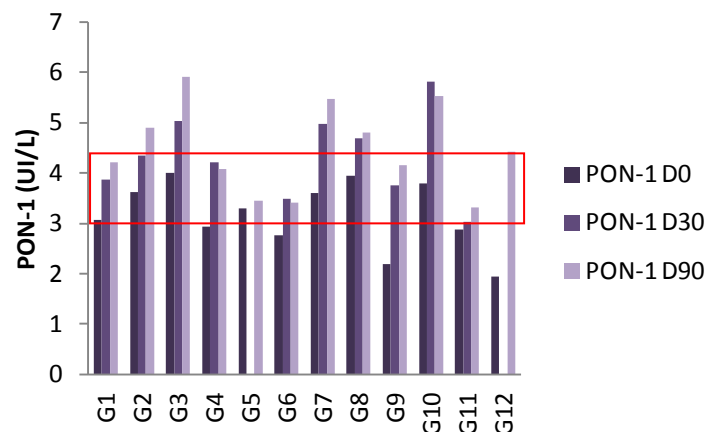


Figura 48: Evolución de la PON-1 en el Grupo G a lo largo de las tres visitas. La caja roja corresponde al intervalo de referencia.

7.2.3.- ANALISIS DESCRIPTIVO DEL GRUPO M en el Día 0, Día 30 y Día 90 (D0, D30 y D90):

7.2.3.1.- Parámetros clínicos:

A.-Puntuación Clínica (PC):

En la Tabla XXX se muestra la evolución de la puntuación clínica de cada paciente a lo largo del tiempo. En la Tabla XXXI se muestra el análisis descriptivo de la puntuación clínica de los pacientes del grupo M en las tres visitas, observándose una reducción de la misma a lo largo del tiempo. El paciente M1 no presentó signos clínicos durante todo el seguimiento, y tampoco los pacientes M4 y M5 en el D90. La reducción de la PC pone de manifiesto la mejoría clínica de los pacientes (Figura 49).

Tabla XXX: Puntuación clínica de los pacientes del grupo M en D0, D30 y D 90.

Paciente	PC D0	PC D30	PC D90
M1	0	0	0
M2	5	2	2
M3	12	3	2
M4	8	8	0
M5	14	3	0
M6	12	3	3
M7	7	3	3
M8	17	4	6

Tabla XXXI: Análisis descriptivo de la puntuación clínica por tiempos D0, D30 Y D90. Grupo M

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
PC D0	8	37/37	9,38	5,45	10	7	0	17
PC D30	8		3,25	2,25	3	1	0	8
PC D90	8		2	2,07	2	3	0	6

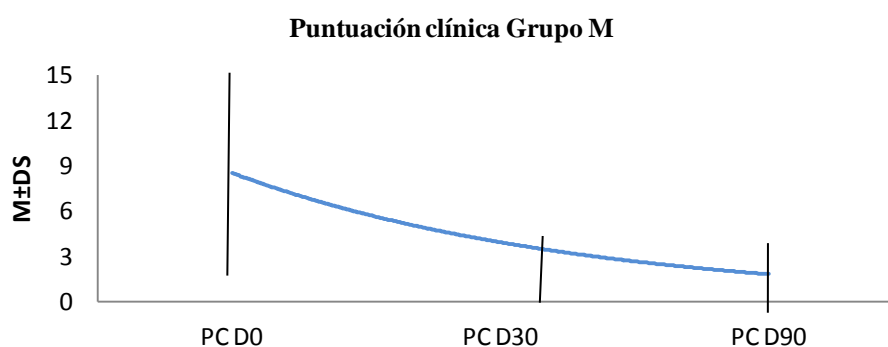


Figura 49: PC (M±DS) de los pacientes del Grupo M a lo largo de las tres visitas

B.- Peso:

En la Tabla V (Anexos) se detalla la evolución del peso de cada paciente a lo largo del tiempo. En la tabla XXXII se muestra el análisis descriptivo del peso de los pacientes del grupo M en las tres visitas, observándose un incremento del mismo a lo largo de las tres visitas (Figura 50).

Tabla XXXII: Análisis descriptivo del peso por tiempos D0, D30 Y D90. Grupo M

Variable	N	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
Peso D0	8	23,01	13,68	25,35	21,40	5	45
Peso D30	8	24,03	12,78	26,15	21,63	9,9	44,5
Peso D90	8	24,31	13,95	27,35	21,30	5,2	46

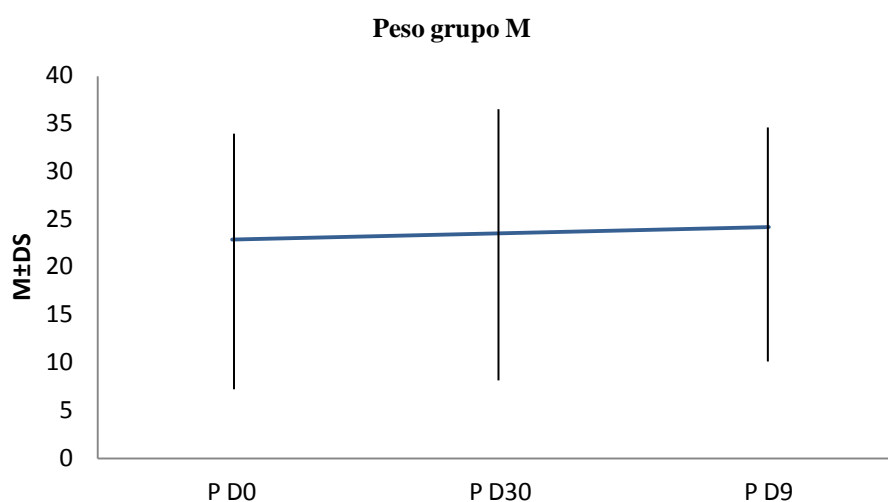


Figura 50: Peso (M±DS) de los pacientes del Grupo M a lo largo de las tres visitas D0, D30 y D90 (M±DS)

C.- Presión arterial sistólica (PAS):

En la Tabla XXXIII se muestra el análisis descriptivo de la presión arterial sistólica de cada paciente del Grupo M en las tres visitas. En la primera visita (D0) 3/8 pacientes (37,5%) (M2, M7 y M8) presentaron la PAS por encima de límite superior. Al final del tratamiento (D30) 5/8 pacientes (62,5%) presentaron la PAS por encima de límite superior. Por último, al final del estudio (D90), 3/8 pacientes (37,5 %) (M2, M4 y M8) presentaron la PAS por encima por encima del límite superior.

Tabla XXXIII: Evolución de la presión arterial sistólica a lo largo de las tres visitas de los pacientes del Grupo M

Paciente	PAS mmHg D30	PAS mmHg D30	PAS mmHg D90
M1	104	110	101
M2	170	190	170
M3	141	130	146
M4	115	176	164
M5	142	133	124
M6	135	154	131
M7	180	180	120
M8	166	168	156

En la Tabla XXXIV se muestra el análisis descriptivo de la evolución de la presión arterial sistólica, observándose una reducción de la misma a lo largo del tiempo

Tabla XXXIV: Análisis descriptivo de la presión arterial por tiempos D0, D30 y D90. Grupo M

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
PAS D0	8	<150 mmHg	144,1	26,70	141,5	43	104	180
PAS D30	8		155,1	28,27	161	46,5	110	190
PAS D90	8		139	23,96	138,5	38	101	170

7.2.3.2.- Diagnóstico parasitológico e inmunológico:

A.- PCR:

En la Tabla XXXV se detalla la evolución de la citología y la PCR de cada paciente a lo largo de las visitas D0 y D90.

Tabla XXXV. Citología de médula ósea, PCR anidada de médula ósea y orina, qPCR (PCR cuantitativa a tiempo real) de médula/linfonódulo en D0 y D90 (POS positivo, NEG negativo, sd sin determinar). Grupo M

Paciente	Médula ósea				Linfonodo				Orina	
	Citología		PCR anidada		qPCR		PCR anidada		PCR anidada	
	D0	D90	D0	D90	D0	D90	D0	D90	D0	D90
M1	sd	sd	sd	d	sd	sd	sd	sd	sd	sd
M2	POS	NEG	POS	POS	1,741	0,002	sd	sd	NEG	NEG
M3	NEG	NEG	NEG	NEG	sd	sd	sd	sd	NEG	NEG
M4	NEG	NEG	NEG	NEG	sd	sd	sd	sd	NEG	NEG
M5	POS	POS	POS	POS	0,012	0,004	sd	sd	NEG	NEG
M6	POS	POS	POS	POS	0,006	0,001	sd	sd	NEG	NEG
M7	NEG	POS	POS	POS	1,441	0,2	sd	sd	NEG	NEG
M8	NEG	sd	POS	sd	0,445	sd	sd	sd	NEG	NEG

B.- IFI y proteinograma:

En Tabla VI (Anexos) se puede observar la evolución del título de anticuerpos entre la primera visita y la última revisión. En el Grupo M 3/8 pacientes (37,5%) (M1, M2, M5) presentaron una reducción de dos títulos en el IFI, lo cual se considera una reducción significativa indicativa de una buena respuesta al tratamiento.

También en la Tabla VI (Anexos) se detalla la evolución de las proteínas plasmáticas en cada paciente.

Al principio del estudio 6/8 pacientes (75%) presentaron hipoalbuminemia, 3/8 (37,5%) (M2, M4 y M5) hiperglobulinemia, 7/8 (87,5%) una reducción del ratio A/G y 5/8 (62,5%) hiperproteinemia (Figuras 51, 52, 53 y 54).

Al final del tratamiento 4/8 pacientes (50%) (M3, M5, M7 y M8) presentaron hipoalbuminemia, 2/8 (25%) (M1 y M5) hiperglobulinemia y 6/8 (75%) (M3, M4, M5, M6, M7 y M8) una reducción del ratio A/G y 2/8 (25%) (M5 y M8) hiperproteinemia (Figuras 51, 52, 53 y 54).

En la última revisión 3/8 pacientes (37,5%) (M2, M3 y M7) presentaron hipoalbuminemia, un paciente (M8) hiperglobulinemia y 5/8 (62,5%) (M2, M3, M4, M7 y M8) una reducción del ratio A/G y 2/8 (25%) (M6 y M8) hiperproteinemia (Figuras 51, 52, 53 y 54).

En la Tabla XXXVI se muestra el análisis descriptivo del proteinograma de los pacientes del Grupo M en las tres visitas.

Tabla XXXVI: Análisis descriptivo del proteinograma por tiempos D0, D30 y D90. Grupo M

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
Alb D0	8	2,7-4,6 g/dl	2,25	0,48	2,2	0,73	1,72	3,08
Alb D30	8		2,54	0,48	2,68	0,83	1,89	3,17
Alb D90	8		2,68	0,71	2,75	1,18	1,83	3,83
GlobT D0	8	2,3-5,5 g/dl	5,53	1,8	5,11	2,19	2,72	8,23
GlobT D30	8		5,3	1,97	4,68	2,03	3,53	9,44
GlobT D90	8		4,64	0,97	4,61	1,4	2,9	5,85
A/G D0	8	0,7-1,9 g/dl	0,46	0,28	0,38	0,12	0,22	1,14
A/G D30	8		0,64	0,31	0,6	0,28	0,31	1,3
A/G D90	8		0,62	0,27	0,54	0,41	0,36	1,1
PT D0	8	5,8-7,5 g/dl	7,88	1,66	7,75	2,25	5,8	10,6
PT D30	8		6,96	1,11	7,05	1,15	5,5	9
PT D90	8		7,26	0,92	7,3	1,2	5,9	8,6

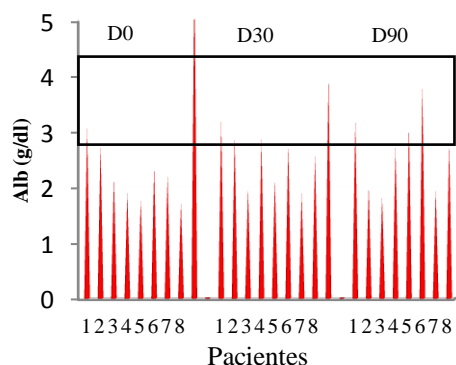


Figura 51: Evolución de la Albúmina en el Grupo M a lo largo de las tres visitas

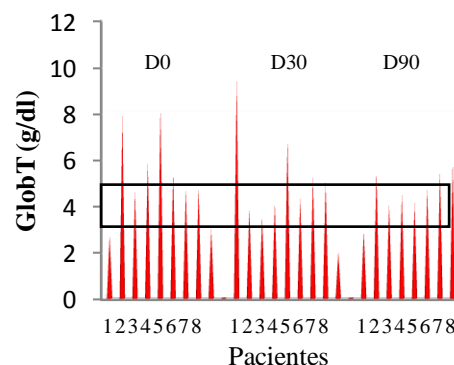


Figura 52: Evolución de las GlobT en el Grupo M a lo largo de las tres visitas

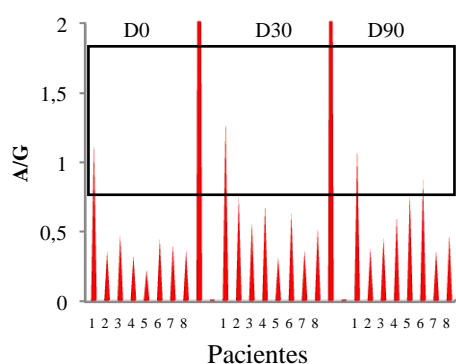


Figura 53: Evolución del ratio A/G en el Grupo M a lo largo de las tres visitas

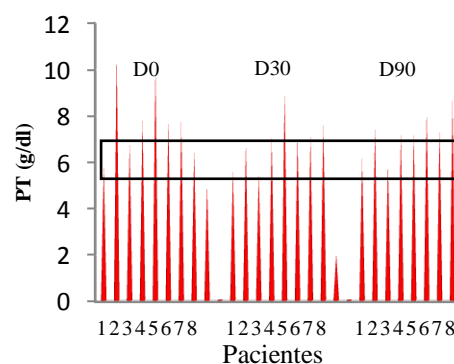


Figura 54: Evolución de las PT en el Grupo M a lo largo de las tres visitas

Figuras 51, 52, 53 y 54 la caja negra corresponde al intervalo de referencia.

7.2.3.3.- Parámetros hematológicos y bioquímicos:

A.- Hemograma:

En la Tabla VII (Anexos) se detalla la evolución de los parámetros del hemograma para cada paciente.

Al principio del estudio 4/8 pacientes (50%) (M2, M5, M6 y M7) presentaron valores de Htc por debajo del rango de referencia. Ningún paciente presentó recuentos de plaquetas por debajo del rango de referencia y tan sólo un paciente (12,5%) (M7) presentó un recuento de GB por debajo del límite de referencia (Figuras 55, 56 y 57).

Terminado el estudio 4/8 pacientes (50%) (M2, M6, M7 y M8) presentaron valores de Htc por debajo del rango de referencia; 2/7 (28,5%) (M7 y M8) recuentos de plaquetas por debajo del rango de referencia y 2/8 (25%) (M7 y M8) recuentos de GB por debajo del límite de referencia (Figuras 55, 56 y 57).

En la Tabla XXXVII se muestra el análisis descriptivo de los parámetros valorados en el hemograma, de los pacientes del Grupo M en las tres visitas. Se observa una reducción del hematocrito, de los glóbulos blancos y de las plaquetas.

Tabla XXXVII: Análisis descriptivo del hemograma por tiempos D0, D30 Y D90. Grupo M

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
Htc D0	8	37-55%	39,68	9,36	36,25	17,1	29,2	53,1
Htc D90	8		36,81	8,62	36	12,4	26	52,1
GB D0	8	6-17 x 10 ³ /μL	10,22	3,28	10,8	3,39	4,9	15,2
GB D90	8		7,83	1,91	8,25	3,45	5,4	10,2
Plaquetas D0	8	200-500 x 10 ³ /μL	292,3	77,56	285,5	146	206	393
Plaquetas D90	7		254	134,5	271	145	38	475

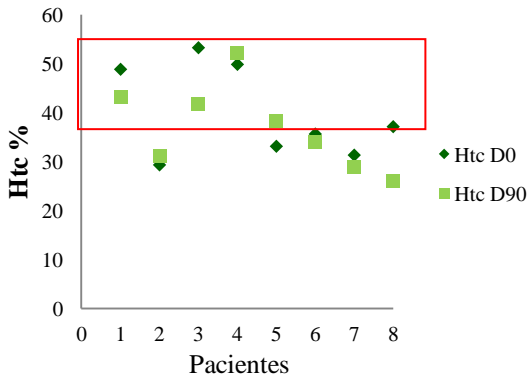


Figura 55: Evolución del Htc en el Grupo M desde D0 a D90

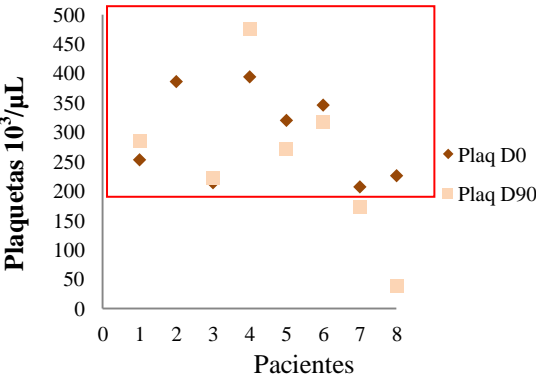


Figura 56: Evolución de las plaquetas en el Grupo M desde D0 a D90

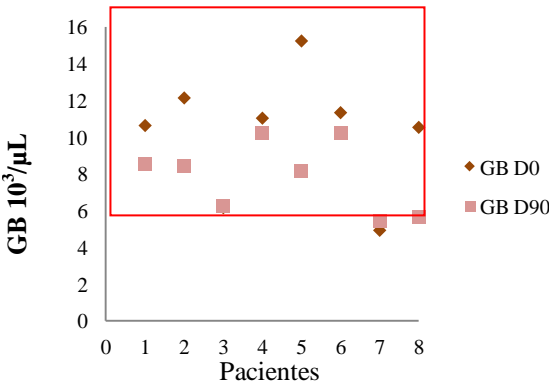


Figura 57: Evolución de GB en el Grupo M desde D0 a D90

Figuras 55, 56 y 57 la caja roja corresponde al intervalo de referencia.

B.- Perfil bioquímico:

En la Tabla VIII (Anexos) se detalla la evolución del perfil bioquímico de cada paciente.

Al inicio del tratamiento un paciente (12,5%) (M3) paciente presentó un valor de ALT por encima del límite de referencia; 3/8 pacientes (37,5%) (M3, M4 y M8) presentaron valores de urea por encima del límite de referencia; 3/8 (37,5%) (M3, M5 y M7) presentaron el Ca por debajo del límite de referencia y 1/8 (12,5%) (M2) presentó valores de fósforo por encima del límite de referencia (Figuras 58, 59, 60 y 61).

En la última revisión 3/8 pacientes (37,5%) (M3, M4 y M8) presentaron valores de urea por encima del límite de referencia; 3/8 pacientes (37,5%) (M2, M3 y M7) presentaron el Ca por debajo del límite de referencia y un perro (12,5%) (M8) presentó valores de fósforo por encima del límite de referencia (Figuras 58, 59, 60 y 61).

En la Tabla XXXVIII se muestra el análisis descriptivo de los parámetros valorados en el estudio bioquímico, de los pacientes del Grupo M en las tres visitas. Se observa una reducción de la ALT y del fósforo inorgánico y un aumento de la urea y del Calcio total (Figuras 58, 59, 60 y 61).

Tabla XXXVIII: Análisis descriptivo de los parámetros bioquímicos por tiempos D0, D30 y D90. Grupo M

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
ALT D0	8	10-66 UI/L	28,25	18,64	21,5	14	11	70
ALT D90	7		21,86	10,22	18	7	14	44
Urea D0	8	15-57 mg/dl	48,5	19,72	49,50	34	23	78
Urea D90	8		56,13	38,20	38	60	21	120
CaT D0	8	9,1-11,7 mg/dl	7,29	3,72	9,05	3,8	0	1
CaT D90	8		9,24	0,56	9,35	0,75	8,2	9,9
Pinorg D0	8	3,3-5,7 mg/dl	4,61	0,74	4,25	0,6	4,1	6,3
Pinorg D90	8		4,34	0,88	4,15	1,4	3,4	5,8

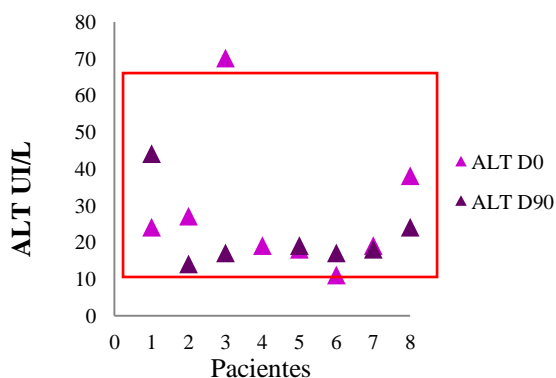


Figura 58: Evolución de la ALT en el Grupo M desde D0 a D90

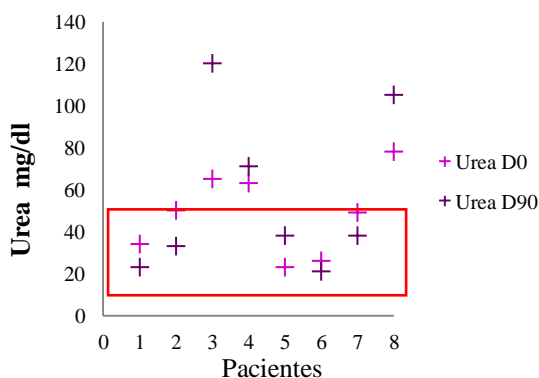


Figura 59: Evolución de la Urea en el Grupo M desde D0 a D90

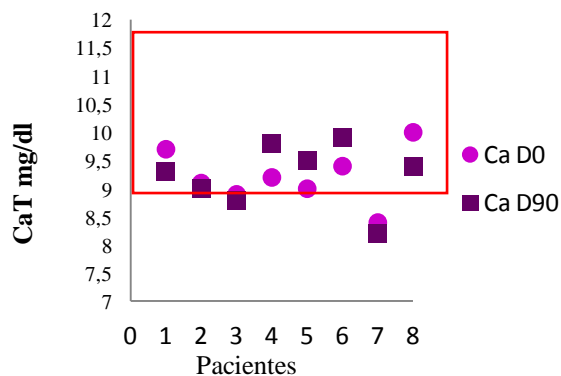


Figura 60: Evolución del CaT en el Grupo M desde D0 a D90

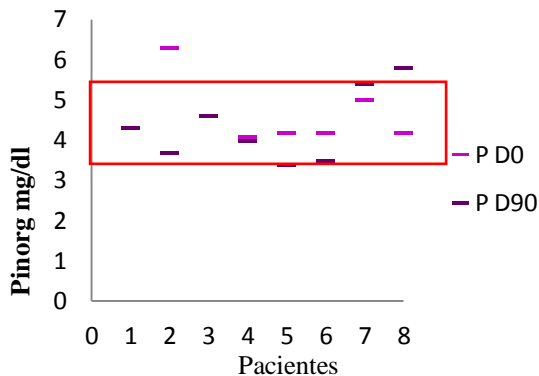


Figura 61: Evolución del Pinorg en el Grupo M desde D0 a D90

Figuras 58, 59, 60 y 61 la caja roja corresponde al intervalo de referencia.

7.2.3.4.- Parámetros de función renal:

A.- Tasa de filtración glomerular (TFG) y creatinina:

En la tabla IX (Anexos) se muestra la evolución de la TFG y de la creatinina de cada paciente.

En la Tabla XXXIX se muestra el análisis descriptivo de los parámetros renales, de los pacientes del Grupo M en las tres visitas. Se observa un aumento de la TFG y de la creatinina plasmática a lo largo de las tres visitas.

Tabla XXXIX: Análisis descriptivo de la TFG por tiempos D0, D30 Y D90. Grupo M

Variable	N	Intervalo de referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
TFG D0	8	2-4,5 ml/kg/min	2.88	1.15	2.65	1.50	1.50	5.00
TFG D90	7		5.59	0.94	2.70	1.60	1.40	4.00
Cr D0	8	0,5-1,4 mg/dl	1.04	0.47	0.95	0.75	0.50	1.85
Cr D30	8		1.08	0.49	1.05	0.80	0.60	1.90
Cr D90	8		1.45	0.76	1.40	1.05	0.60	2.80

En la Figura 62 se representa el aclaramiento de creatinina exógena de los pacientes del Grupo M en la primera visita (D0). Al inicio del tratamiento todos los pacientes tuvieron TFG dentro del rango de referencia a excepción los pacientes M3 y M4 que presentaron valores inferiores al límite de referencia.

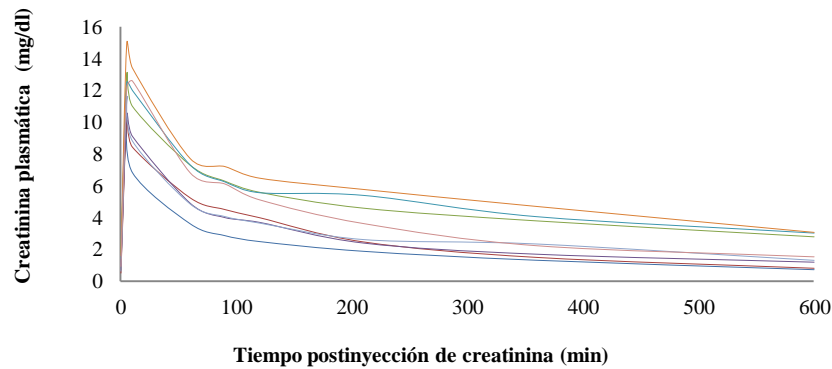


Figura 62: Aclaramiento de creatinina exógena grupo M D0

En la Figura 63 se representa el aclaramiento de creatinina exógena de los pacientes del Grupo M en la última visita (D90). Al final del tratamiento todos los pacientes tuvieron TFG dentro del rango de referencia a excepción de los paciente M3 y M4.

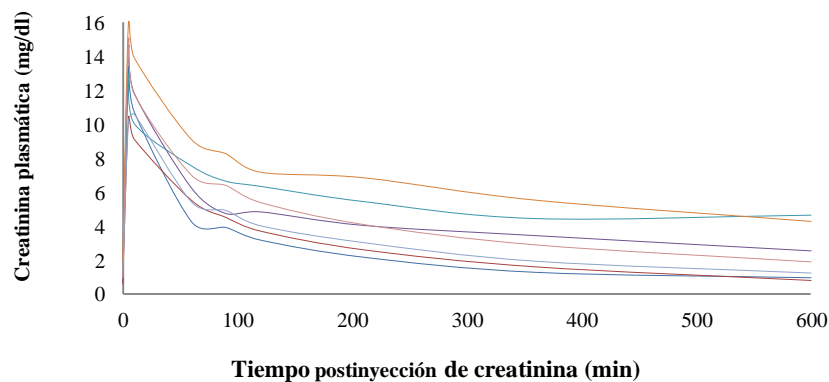


Figura 63: Aclaramiento de creatina exógena grupo M D90

En relación a la creatinina, dos pacientes 2/8 (25%) (M4 y M8) mantuvieron el valor por encima del límite de referencia en todas las visitas (Figura 64).

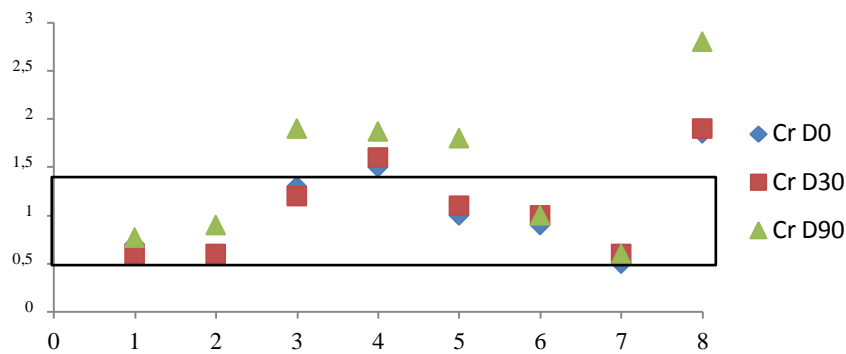


Figura 64: Evolución de la Creatinina en el Grupo M a lo largo del tiempo (D0, D30 y D90). La caja negra representa el rango de referencia.

B.- Ratio proteína/creatinina en orina (UPC):

En la Tabla IX (Anexos) se detalla la evolución del UPC en cada paciente. Aunque se observó una reducción de la proteinuria a lo largo del tiempo (Tabla XL), 4/5 pacientes (80%) (M2, M4, M6, M7 y M8) que presentaban inicialmente proteinuria, se siguieron manteniendo en el rango proteinúrico al final del estudio.

Tabla XL: Evolución de la proteinuria a lo largo del tiempo. Grupo M. (NP: No proteinúrico, BP: Borderline proteinúrico, P: proteinúrico)

Paciente	UPC D0 D0	UPC D30 D30	UPC D90 D90	UPC D0	UPC D30	UPC D90
M1	0,13	0,1	0,12	NP	NP	NP
M2	6,4	1,7	1,62	P	P	P
M3	2,9	1,42	0,4	p	P	BP
M4	1,65	2,8	2,73	P	P	P
M5	0,4	0,21	0,09	BP	BP	NP
M6	4	10,5	0,52	P	P	p
M7	8,4	8,48	8	P	P	P

En la Tabla XLI se muestra el análisis descriptivo del UPC, de los pacientes del Grupo M en las tres visitas. En general se observa una reducción de los valores medios de proteinuria.

Tabla XLI: Análisis descriptivo del UPC por tiempos D0, D30 y D90. Grupo M

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
UPC D0	7	<0.5	3.31	2.88	2.75	4.18	0.13	8.40
UPC D30	7		2.30	2.66	1.60	1.69	0.10	8.48
UPC D90	7		2.05	2.66	1.07	2.56	0.09	8.00

C.- Densidad de la orina (DU):

En la Tabla IX (Anexos) se detalla la evolución de la DU de cada paciente. Se puede observar que en D0, 1/8 paciente (12,5%) (M6) presentó una densidad por debajo del límite inferior; en D30, 2/8 pacientes (25%) (M4 y M6) presentaron densidades por debajo del límite inferior; en D90, un paciente (M7) presentó una densidad por debajo del límite inferior.

En la tabla XLII y Figura 65 se muestra el análisis descriptivo y la evolución de DU del grupo M en los tres visitas. Se observa una reducción de la DU y un valor mínimo por debajo del límite inferior en las tres visitas.

Tabla XLII: Análisis descriptivo de la DU por tiempos D0, D30 y D90. Grupo M

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
DU D0	8	1,015-1,050	1026	15.56	1031	20.50	1006	1038
DU D30	8		1023	11.86	1021	18.50	1010	1043
DU D90	8		1023	6.54	1024	7.50	1010	1031

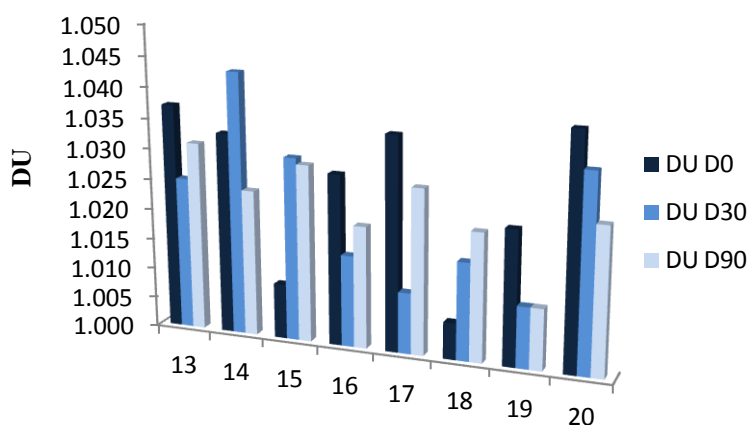


Figura 65: Evolución de la DU en el Grupo M a lo largo de las tres visitas

D.- Electroforesis de proteínas en orina (SDS-PAGE):

En la Tabla X (Anexos) se observa la evolución del porcentaje D.O de las proteínas presentes en la orina de los perros del Grupo M.

En la Tabla XLIII se muestra el análisis descriptivo de la suma del porcentaje de las densidades ópticas (D.O.) correspondiente a las proteínas de alto peso molecular (PAPM) y de bajo peso molecular (PBPM), en el Grupo M a lo largo del tiempo. A lo largo del tiempo se observó un aumento del porcentaje de la D.O. PAPM y una reducción del porcentaje de D.O. PBPM (Figuras 66 y 67).

Tabla XLIII: Análisis descriptivo de la electroforesis SDS-PAGE por tiempos D0, D30 y D90. Grupo M

Variable	N	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
% D.O. PAPM D0	7	64,51	11,77	59,4	23,5	52,4	83,1
% D.O. PAPM D30	7	70,60	13,65	71,9	15	42,5	82,7
% D.O. PAPM D90	7	74,90	13,24	75,5	18,4	49,9	89,3
% D.O. PBPM D0	7	35,49	11,77	40,6	23,5	16,9	47,6
% D.O. PBPM D30	7	29,40	13,65	28,1	15	17,3	57,5
% D.O. PBPM D90	7	25,10	13,24	24,5	18,4	10,7	50,1

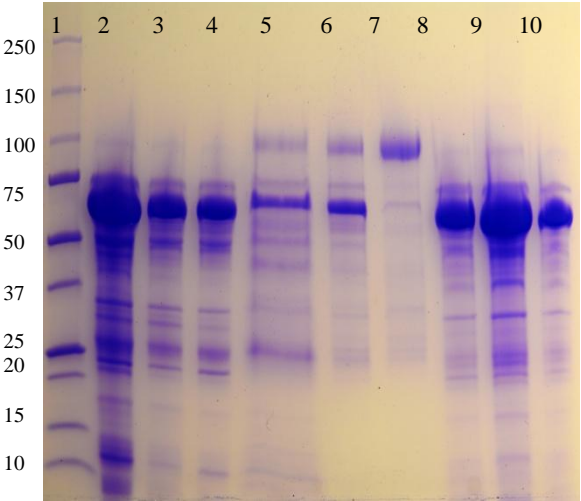


Fig. 66: Grupo M. Electroforesis de proteínas de la orina SDS-Page. Tinción Azul Coomasie.

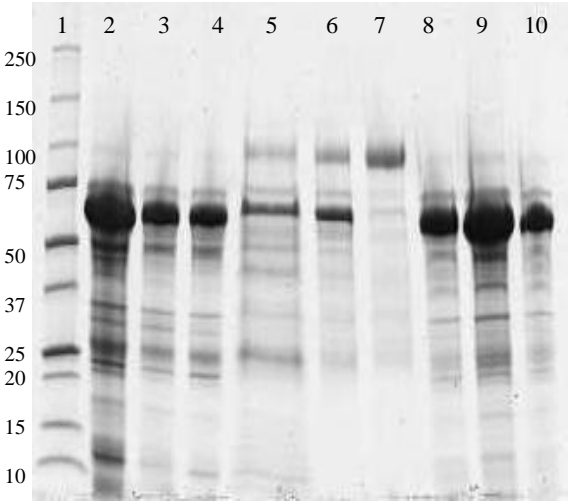


Fig. 67: Grupo M. Electroforesis de proteínas de la orina SDS-Page. Lectura mediante densitometría.

Fig.66: Electroforesis de proteínas urinarias en SDS-PAGE tinción con azul Coomasie. Calle 1 marcadores de peso molecular. En las siguientes calles tres muestras consecutivas (D0, D30 y D90) de tres pacientes diferentes (M7, M5 y M3). En la línea vertical de la izquierda de la imagen se muestran los pesos moleculares del marcador en kDa. **Fig 67:** Misma imagen que la anterior leída mediante densitometría

En las Figuras 68, 69 y 70 se representan esquemáticamente la variación en los porcentajes D.O. de las proteínas urinarias a lo largo del tiempo.

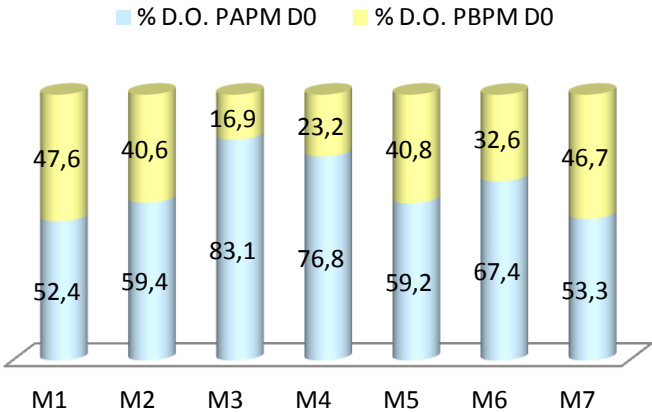


Figura 68: Porcentaje de D.O. de las proteínas urinarias en el Grupo M en el momento D0

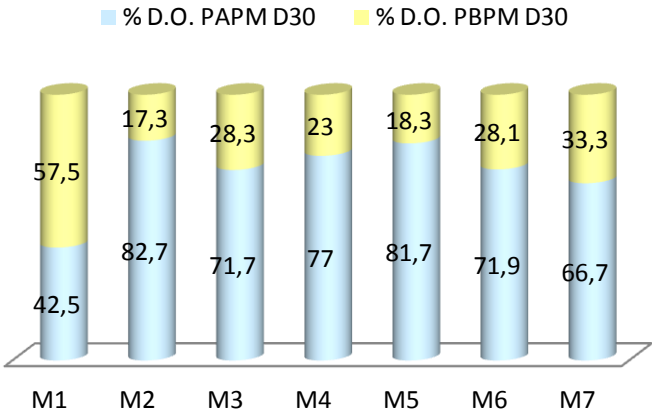


Figura 69: Porcentaje de D.O. de las proteínas urinarias en el Grupo M en el momento D30

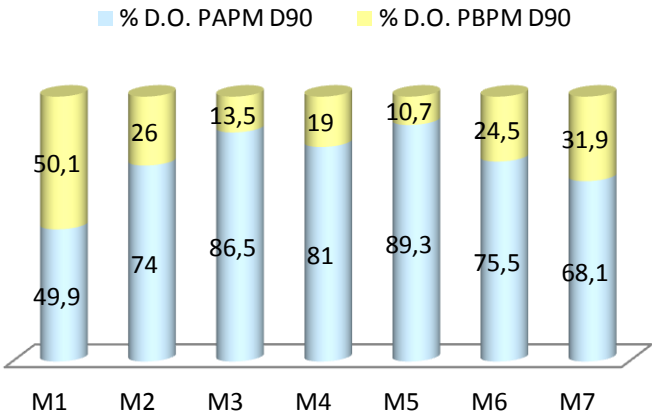


Figura 70: Porcentaje de D.O. de las proteínas urinarias en el Grupo M en el momento D90

7.2.3.5.- Proteínas de fase aguda (PFA):

En la Tabla XI (Anexos) se detalla la evolución de las distintas PFA en cada paciente del grupo M a lo largo de las tres visitas.

En la Tabla XLIV se muestra el análisis descriptivo de las PFA en el grupo M a lo largo del tiempo. Se observó una reducción de las Prot.CR del momento 0 al 30 y un aumento del 30 al 90. La Hp y la FS se redujeron a lo largo del tiempo, mientras que PON-1 aumentó.

Tabla XLIV: Análisis descriptivo de las proteínas de fase aguda por tiempos D0, D30 y D90. Grupo M

Variable	N	Intervalo referencia	Media	DS	Mediana	RI	Min	Max
Prot.CR D0	8	<12 µg/ml	19,75	15,24	14,10	25,15	5	44,9
Prot.CR D30	8		12,84	15,62	5	14,15	0,8	43,6
Prot.CR D90	8		18,6	31,32	5	15,75	0,2	92,7
Hp D0	8	<3 g/L	3,99	1	4,04	1,21	2,24	5,42
Hp D30	8		3,76	1,58	4,05	2,2	0,85	5,71
Hp D90	8		3,31	1,31	3,38	1,2	0,9	5,41
FS D0	8	60-190 µg/L	568,4	345,6	746,4	659,2	94,3	883,5
FS D30	8		464,6	263,6	413,6	377,7	83,1	881,9
FS D90	8		420,3	297,7	326,4	407,7	93,9	890,5
PON-1 D0	8	3-4.3 UI/L	3,65	0,92	3,94	1,23	2,1	4,67
PON-1 D30	8		3,62	0,79	3,96	1,23	2,2	4,30
PON-1 D90	8		3,92	0,88	3,96	1,37	3,39	4,78

A.- Prot. CR (Figura 71):

En la primera visita (D0) 4/8 perros (50%) (M1, M5, M7 y M8) presentaron valores de Prot. CR por encima del límite de referencia.

Al final del tratamiento (D30) 2/8 pacientes (25%) (M7 y M8) presentaron valores de Prot. CR por encima del límite de referencia.

En la última revisión (D90) 2/8 perros (25%) (M2, M7 y M8) presentaron valores de Prot.CR por encima del límite de referencia.

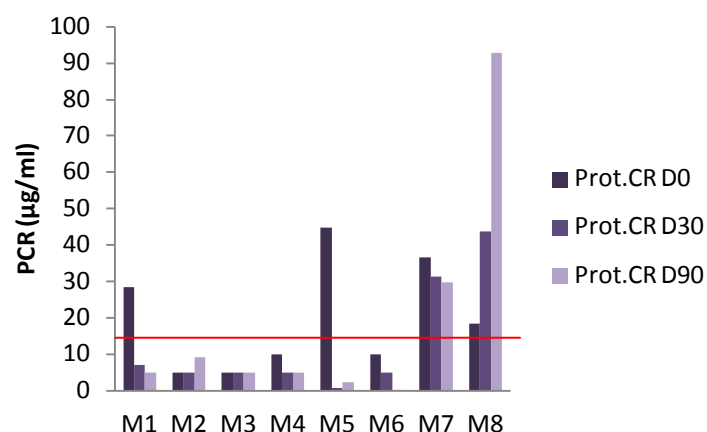


Figura 71: Evolución de la Prot. C Reactiva en el Grupo M a lo largo de las tres visitas. La línea roja corresponde al límite de referencia.

B.- Haptoglobina (Hp) (Figura 72)

En la primera visita (D0) 7/8 pacientes (87,5%) (M1, M2, M3, M4, M6, M7 y M8) presentaron valores de Hp por encima del límite de referencia.

Al final del tratamiento (D30) 5/8 perros (62,5%) (M1, M2, M4, M7 y M8) presentaron valores de Hp por encima del límite de referencia.

En el último chequeo (D90) 5/8 pacientes (62,5%) (M1, M2, M4, M7 y M8) presentaron valores de Hp por encima del límite de referencia.

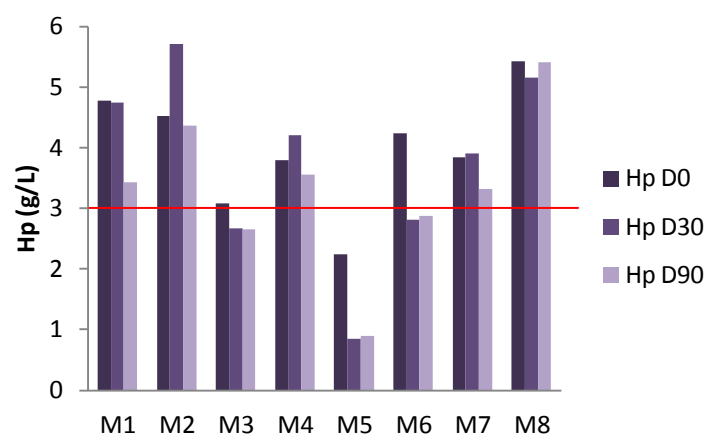


Figura 72: Evolución de la Hp en el Grupo M a lo largo de las tres visitas. La línea roja corresponde al límite de referencia.

C.- Ferritina (FS) (Figura 73):

En un primer momento (D0) 6/8 perros (75%) (M2, M3, M5, M6, M7 y M8) presentaron valores de FS por encima del límite de referencia y 2/8 pacientes (25%) (M1 y M4) en el rango de referencia.

Al final del tratamiento (D30) al igual que en el último control (D90), 7/8 (87,5%) (M2, M3, M4, M5, M6, M7 y M8) presentaron valores de FS por encima del límite de referencia y un paciente (12.5%) (M1) en el rango de referencia

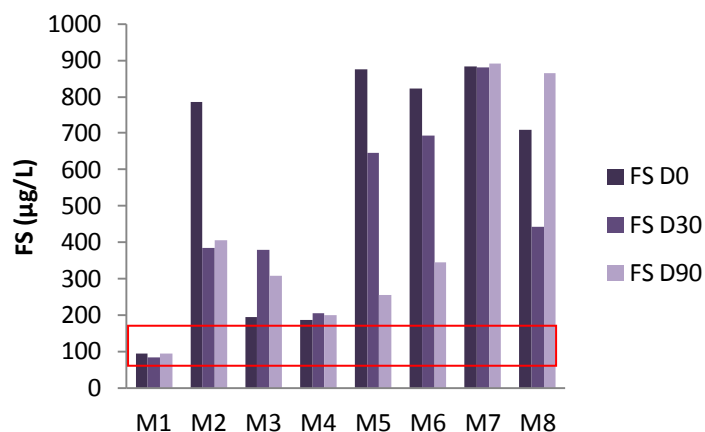


Figura 73: Evolución de la FS en el Grupo M a lo largo de las tres visitas. La caja roja corresponde al intervalo de referencia.

D.- Paraoxonasa-1(PON-1) (Figura 74):

En la primera visita (D0) 2/8 pacientes (25%) (M5 y M7) presentaron valores de PON-1 por debajo del límite de referencia y 2/8 (25%) (M1 y M2) presentaron valores por encima del límite de referencia.

Al final del tratamiento (D30) 2/8 perros (25%) (M5 y M7) presentaron valores de PON-1 por debajo del límite de referencia y 6/8 (75%) presentaron valores en el rango de referencia.

En el último chequeo (D90) un paciente (12,5%) (M7) presentó valores de PON-1 por debajo del límite de referencia y 4/8 (50%) (M1, M4, M5 y M6) presentaron valores por encima del límite de referencia

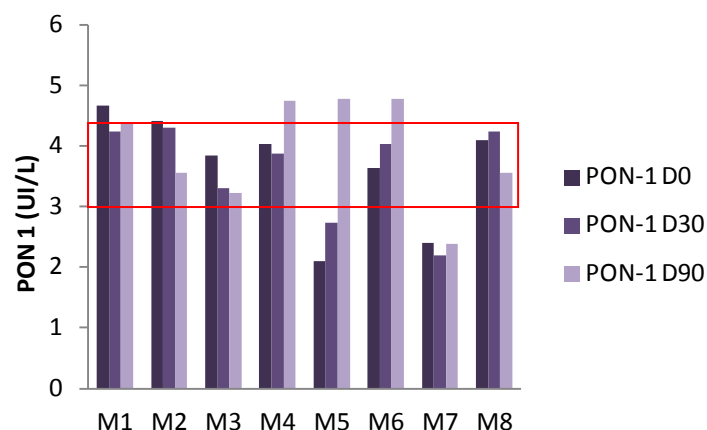


Figura 74: Evolución de PON-1 en el Grupo M a lo largo de las tres visitas. La caja roja corresponde al intervalo de referencia.

7.3.- ANALISIS COMPARATIVO

7.3.1.- COMPARACIÓN ENTRE LOS DOS GRUPOS DE TRATAMIENTO: Grupo G *versus* grupo M

7.3.1.1.- Parámetros clínicos:

A.-Puntuación clínica (PC):

Como se puede observar en la Tabla XLV no existieron diferencias estadísticamente significativas en la puntuación clínica de los pacientes de ambos grupos en ninguna de las tres visitas.

Tabla XLV: Puntuación clínica por tiempos D0, D30 y D90 (M±SD, significativo p<0,05)

Grupo	D0		D30		D90	
	Mediana±SD	p	Mediana±SD	p	Mediana±SD	p
G	8,50±3,79	0,5932	3±5,56	0,9691	2±1,37	0,9681
M	5,45±5,45		2,25±2,25		2,07±2,07	

Del mismo modo tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el incremento promedio de la puntuación clínica en los rangos de tiempo (Tabla XLVI).

Tabla XLVI: Δ de la puntuación clínica por rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90 (significativo, p<0,05)

	Rango 0-30	Rango 0-90	Rango 30-90
	Δ promedio	Δ promedio	Δ promedio
PC	p 0,3443	p 0,5675	p 0,3967

Los factores tiempo y fármaco no interactuaron conjuntamente sobre el peso de los pacientes. Sin embargo el factor tiempo si que interaccionó de manera individual con el peso $p < 0,0001$ (Tabla XLVII).

Tabla XLVII: ANOVA bifactorial de medidas repetidas en el tiempo: comparación tiempo-fármaco (significativo $p < 0.05$)

Variable dependiente	Fármaco	Tiempo	Tiempo*Fármaco
Peso	p 0,8900	p <0.0001	p 0,1331

No hubo diferencias estadísticamente significativas en el peso entre los dos grupos de tratamiento en las tres visitas (Tabla XLVIII).

Tabla XLVIII: T-Test. Comparación de fármacos por tiempo D0, D30 y D90 ($M \pm SD$, significativo $p < 0.05$)

	D0		D30		D90	
	Mediana \pm SD	p	Mediana \pm SD	p	Mediana \pm SD	p
G	21,52 \pm 8,69	p 0,1724	22,17 \pm 8,42	p 0,2237	24,65 \pm 10,56	p 0,3928
M	23,01 \pm 13,68		24,03 \pm 12,78		24,31 \pm 13,95	

Según estos resultados el incremento de peso de los pacientes no se debe a la administración de uno u otro fármaco, ya que ambos fármacos producen una mejoría en el estado clínico de los pacientes.

C.- Presión arterial sistólica (PAS):

En relación a las presiones arteriales sistólicas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento en las visitas realizadas (Tabla XLIX), ni en el incremento promedio en los rangos de tiempo (Tabla L).

Tabla XLIX: Presión arterial sistólica por tiempos D0, D30 y D90. ($M \pm SD$, significativo p valor < 0.05)

Grupo	D0		D30		D90	
	Mediana \pm SD	p	Mediana \pm SD	p	Mediana \pm SD	p
G	141 \pm 41,14	0,8705	137 \pm 29,75	0,5194	138,5 \pm 23,36	0,6217
M	141,5 \pm 26,70		161 \pm 28,27		138 \pm 23,96	

Tabla L: Δ de la presión arterial por rangos de tiempo 0-30. 0-90 y 30-90 (significativo $p < 0,05$)

	Rango 0-30	Rango 0-90	Rango 30-90
	Δ promedio	Δ promedio	Δ promedio
PAS	p 0,1338	p 0,2794	p 0,3461

7.3.1.2.- Diagnóstico parasitológico e inmunológico:

A.- IFI:

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el número de pacientes en los que el IFI bajó dos diluciones. De esta manera en el Grupo G el 33,33 % de los pacientes no diluyeron el título IFI dos diluciones y en el Grupo M, sí que se produjo este cambio en el 37,50 % de los pacientes (Tabla LI).

Tabla LI: Reducción por grupos del título de IFI

Fármaco	No	Si	Total
G	4	8	12
	33,33	66,67	
M	5	3	8
	62,50	37,50	
	9	11	20

B.- Proteinograma:

En relación a las diferentes fracciones de proteínas plasmáticas no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento en ninguna de las tres visitas (Tabla LII).

Tabla LII: Electroforesis de proteínas plasmáticas por tiempos D0, D30 y D90 (Mediana±SD, significativo p<0,05)

	D0			D30			D90		
	G	M	p	G	M	p	G	M	p
Alb	2,28±0,72	2,20±0,48	0,9393	2,91±0,71	2,68±0,48	0,3859	3,75±0,89	2,75±0,71	0,1301
GlobT	5,75±2,10	5,11±1,80	0,5198	3,98±1,56	4,68±1,97	0,1928	3,62±1,56	4,61 ±0,97	0,1136
A/G	0,39±0,22	0,38±0,28	0,8490	0,72±0,29	0,60±0,31	0,5197	1,09±0,43	0,54±0,27	0,0683
PT	8,25±1,85	7,75±1,66	0,4720	7,20±1,52	7,05±1,11	0,8189	6,90±1,05	7,30±0,92	0,8786

Sin embargo entre los grupos hubo una diferencia estadísticamente significativa en el incremento promedio de A/G en el rango de tiempo 30-90, 0-90 (Tabla LIII).

Tabla LIII: Δ de las proteínas del proteinograma por rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90 (significativo p< 0,05)

	Rango 0-30	Rango 0-90	Rango 30-90
	Δ promedio	Δ promedio	Δ promedio
Alb	p 0,4279	p 0,1928	p 0,1697
GlobT	p 0,3860	p 0,1489	p 0,1808
AG	p 0,6486	p 0,0472	p 0,0319
PT	p 0,7609	p 0,7900	p 0,2046

7.3.1.3.- Parámetros hematológicos y bioquímicos:

A.- Hematología:

De los parámetros valorados en el hemograma no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de ellos, salvo en el hematocrito realizado en el último chequeo (D90) (Tabla LIV) y en el incremento del mismo desde el inicio hasta el final del estudio. Como se verá más adelante en el análisis de grupos, el Htc aumentó significativamente en el Grupo G (Tabla LV).

Tabla LIV: Parámetros hematológicos por tiempos D0 y D90 (Mediana±SD, significativo p<0,05)

	D0			D90		
	G	M	p	G	M	p
Htc	39,45±8,01	36,25±9,36	0,9696	48,40±7,23	36±8,62	0,0346
GB	9,95±3,42	10,80±3,28	0,5696	9,05±3,84	8,25±1,91	0,2460
Plaquetas	261±98,75	285,5±77,56	0,6313	344,5±94,53	271±134,5	0,3676

Tabla LV: Δ de los parámetros hematológicos por rangos de tiempo 0-90 (significativo p<0,05)

Rango 0-90	
	Δ promedio
Ht	p 0,0197
GB	p 0,0988
Plaquetas	p 0,3828

B.- Perfil bioquímico:

No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los parámetros bioquímicos determinados en ninguna de las visitas (Tabla LVI).

Tabla LVI: Parámetros bioquímicos por tiempos D0 y D90 (Mediana±SD, significativo p<0,05)

	D0			D90		
	G	M	p	G	M	p
ALT	21,50±24,36	21,50±18,64	0,6756	29±199	18±18	0,1561
Urea	36,50±36,90	49,50±19,72	0,5696	26,50±32,09	38±38,20	0,1480
CaT	9,05±0,56	9,15±0,49	0,8189	9,35±0,59	9,35±0,56	0,7313
Pinorg	4,40±2,31	4,25±0,74	0,7883	4,15±0,61	4,34±0,88	0,9387

No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en el incremento promedio de ninguno de los parámetros bioquímicos (Tabla LVII).

Tabla LVII: Δ de los parámetros bioquímicos por rangos de tiempo 0-90, $p < 0,05$

Rango 0-90	
	Δ promedio
ALT	p 0,2063
Urea	p 0,1696
CaT	p 0,9090
Pinorg	p 0,1691

7.3.1.4.- Parámetros de función renal:

A.- Tasa de filtración glomerular (TFG):

El test ANOVA bifactorial de medidas repetidas en el tiempo demostró que los factores tiempo y fármaco no interactuaron conjuntamente sobre la TFG. Es decir ni el fármaco ni el paso del tiempo, ni el fármaco administrado a lo largo del tiempo produjeron ningún efecto sobre la TFG (Tabla LVIII y Figura 75).

Tabla LVIII: Interacción tiempo-fármaco sobre la TFG (significativo $p < 0,05$)

Variable dependiente	Fármaco	Tiempo	Tiempo*Fármaco
TFG	p 0,1169	p 0,4780	p 0,9542

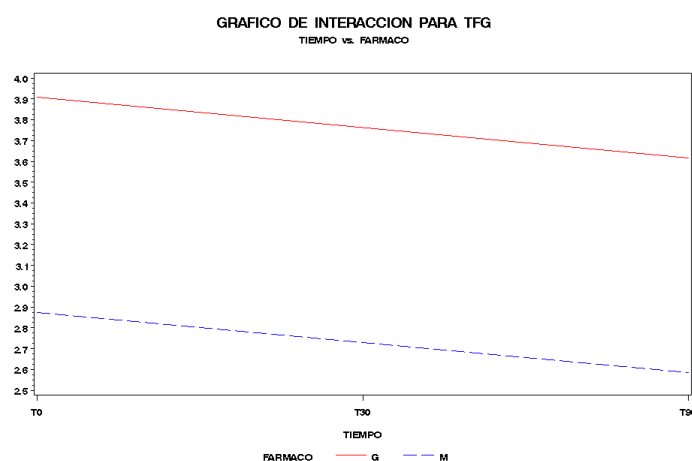


Figura 75: Gráfico de interacción fármaco/ tiempo sobre la TFG

Según el test de Duncan no se observaron diferencias significativas en la TFG entre los grupos de tratamiento ni a lo largo del tiempo.

B.- Creatinina:

Entre los grupos de tratamiento no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el valor de creatinina en ninguno de las tres visitas (Tabla LIX).

Tabla LIX: Creatinina por tiempos D0, D30 y D90 (Mediana \pm SD, significativo $p<0,05$)

Grupo	D0		D30		D90	
	M \pm SD	p	M \pm SD	p	M \pm SD	p
G	0,70 \pm 0,37	0,3624	0,90 \pm 0,54	0,6465	0,78 \pm 0,49	0,0914
M	0,95 \pm 0,47		1,05 \pm 0,49		1,40 \pm 0,76	

Sin embargo, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas para el incremento de creatinina en los intervalos de tiempo 30-90 y 0-90. Como se verá posteriormente en el análisis de grupos la creatinina aumentó en el Grupo G en el intervalo 0-30 y en el Grupo M en el intervalo 30-90 y 0-90 (Tabla LX).

Tabla LX: Δ de la creatinina por rangos de tiempo 0-30, 0-90, 30-90 (significativo $p<0,05$)

	Rango 0-30	Rango 0-90	Rango 30-90
	Δ promedio	Δ promedio	Δ promedio
Cr	p 0,0830	p 0,0401	p 0,0085

C.- Ratio proteína/creatinina en orina (UPC):

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el UPC en ninguna de las visitas (Tabla LXI).

Tabla LXI: UPC por tiempos D0, D30 y D90 (M \pm DS, significativo $p<0,05$)

Grupo	D0		D30		D90	
	M \pm SD	p	M \pm SD	p	M \pm SD	p
G	0,57 \pm 1,93	0,1077	0,23 \pm 2,25	0,0857	0,19 \pm 1,43	0,1155
M	2,75 \pm 2,88		1,60 \pm 2,66		1,07 \pm 2,60	

Tampoco se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en el incremento promedio del UPC en los rangos de tiempo entre las visitas (Tabla LXII).

Tabla LXII: Δ UPC por rangos de tiempo 0-30, 0-90, 30-90 (significativo $p<0,05$)

	Rango 0-30	Rango 0-90	Rango 30-90
	Δ promedio	Δ promedio	Δ promedio
UPC	P 0,4917	p 0,7759	p 0,1771

D.- Densidad de la orina (DU):

Los factores tiempo y fármaco no interactuaron conjuntamente sobre la densidad de la orina (Tabla LXIII y Figura 76).

Tabla LXIII: Interacción tiempo-fármaco sobre DU (significativo $p<0,05$)

Variable dependiente	Fármaco	Tiempo	Tiempo*Fármaco
DU	p 0,3636	p 0,2885	p 0,16112

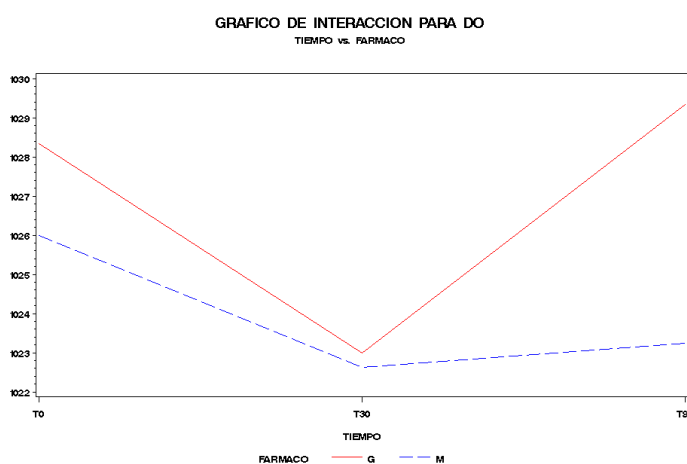


Figura 76: Gráfico de interacción fármaco/ tiempo sobre la DU

Según el test de Duncan no se observaron diferencias en la DU entre los grupos de tratamiento ni tampoco a lo largo del tiempo.

D.- Electroforesis de proteínas en orina (SDS-PAGE):

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de D.O. de PAMP y PBPM al terminar el tratamiento (Tabla LXIV). Estas diferencias fueron más notables en el incremento promedio del porcentaje de D.O. en el rango de tiempo 30-90 (Tabla LXV).

Tabla LXIV: Diferencias en el porcentaje de D.O. PAMP y PBPM entre grupos y por tiempo D0, D30 y D90 (Mediana \pm DS, significativo $p<0,05$).

	%D.O. PAMP			%D.O. PBPM		
	G	M	p	G	M	p
D0	68,80 \pm 19,62	59,40 \pm 11,77	p 0,5345	33,20 \pm 19,66	40,60 \pm 11,77	p 0,5345
D30	86,80 \pm 9,44	71,90 \pm 13,65	p 0,0369	13,20 \pm 9,44	28,10 \pm 13,65	p 0,0369
D90	78,55 \pm 16,63	75,50 \pm 13,24	p 0,8104	21,45 \pm 21,45	24,50 \pm 13,24	p 0,8104

Tabla LXV: Diferencias en el Δ en el porcentaje de D.O. entre los grupos por rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90, (significativo $p < 0,05$)

	Rango 0-30	Rango 0-90	Rango 30-90
	Δ promedio	Δ promedio	Δ promedio
%D.O. PAPM	p 0,3120	p 0,7371	p 0,0242
%D.O. PBPM	p 0,3331	p 0,7371	p 0,0242

E.- Cristales de xantina:

No hubo diferencias en la presencia de cristales de xantina en las tres visitas independientemente del fármaco administrado (Tabla LXVI). El test de Macnemar confirmó que con el tiempo no hay patrón de cambio (Tabla LXVII).

Tabla LXVI: Diferencias entre grupos en la presencia de cristales de xantina por rangos de tiempo D0, D30 y D90 (significativo, $p < 0,05$)

	D0	D30	D90
Chi-Cuadrado (probabilidad)	p 1	p 0,4936	p 0,6481
Test exacto de Fisher	p 1	p 0,6186	p 1

Tabla LXVII: Test de Macnemar. Diferencias entre grupos en la presencia de cristales de xantina por rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90 (significativo $p < 0,05$).

	0-30	0-90	30-90
p	0,7657	0,7055	1

7.3.1.5.- Proteínas de fase aguda (PFA):

En lo que se refiere a las proteínas inflamatorias no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento en ninguna de las tres visitas (Tablas LXVIII y LXIX). Sin embargo en los rangos de tiempo 0-30 y 0-90 se observaron diferencias significativas para la Ferritina y PON-1 (Tabla LXX).

Tabla LXVIII: Proteínas inflamatorias (Prot.CR y Hp). Diferencias entre grupos de tratamiento en las tres visitas D0, D30 y D90 (Mediana \pm DS, significativo $p < 0,05$)

	Prot.CR			Hp		
	G	M	p	G	M	p
D0	25,75 \pm 34,71	14,10 \pm 15,24	0,5645	4,07 \pm 1,30	4,04 \pm 1	p 0,8790
D30	5 \pm 3,85	5 \pm 15,62	0,7156	3,71 \pm 1,39	4,05 \pm 1,58	p 0,8268
D90	5 \pm 5,93	5 \pm 31,32	0,9644	3,73 \pm 1,55	3,38 \pm 1,31	p 0,6761

Tabla LXIX: Proteínas inflamatorias (FS y PON-1). Diferencias entre grupos de tratamiento en las tres visitas D0, D30 y D90 (Mediana±DS, significativo p <0.05)

	FS			PON-1		
	G	M	p	G	M	p
D0	843,6±227,4	746,4±345,6	p 0,1694	3,18±0,66	3,94±0,92	p 0,1136
D30	260,6±102,5	413,6±236,6	p 0,1186	4,28±0,83	3,96±0,79	p 0,1861
D90	234,1±61,54	326,4±297,7	p 0,1696	4,33±0,87	3,96±0,88	p 0,2769

Tabla LXX: Proteínas inflamatorias. Diferencias entre grupos de tratamiento por rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90 (significativo p<0,05)

	Rango 0-30	Rango 0-90	Rango 30-90
	Δ promedio	Δ promedio	Δ promedio
Prot. CR	p 0,2421	p 0,2150	p 0,5986
Hp	p 0,6943	p 0,5696	p 0,6623
FS	p 0,0085	p 0,0214	p 0,5711
PON-1	p 0,0039	p 0,0404	p 0,8954

7.3.2.- EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DEL GRUPO G

7.3.2.1- Parámetros clínicos:

A.- Puntuación clínica (PC):

En el grupo G se observó una reducción estadísticamente significativa en la puntuación clínica en todos los rangos de tiempo; * p 0,0264, ** p 0,0313, *** p 0,0005 (Tabla LXXI y Figura 77).

Tabla LXXI: Δ promedio de la puntuación clínica por rangos de tiempo tiempo 0-30, 0-90 y 30-90. Grupo G (significativo p<0,05)

	Rango 0-30		Rango 0-90		Rango 30-90	
	Δ promedio	*p	Δ promedio	***p	Δ promedio	**p
PC	-6	p 0,0264	-6,50	p 0,0005	-0,5	p 0,0313

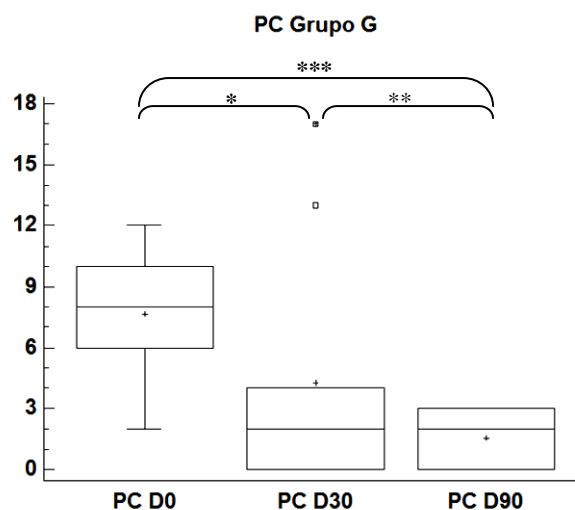


Figura 77: Puntuación clínica en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla LXXI.

C.- Peso:

El fármaco G tuvo un efecto positivo sobre el peso a lo largo del tiempo $p < 0.001$, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los rangos de tiempo 30-90 y 0-90.

B.- Presión arterial sistólica (PAS):

En el Grupo G se observó una reducción estadísticamente significativa de las PAS en el rango de tiempo 0-90; *** p 0,0352 (Figura 78).

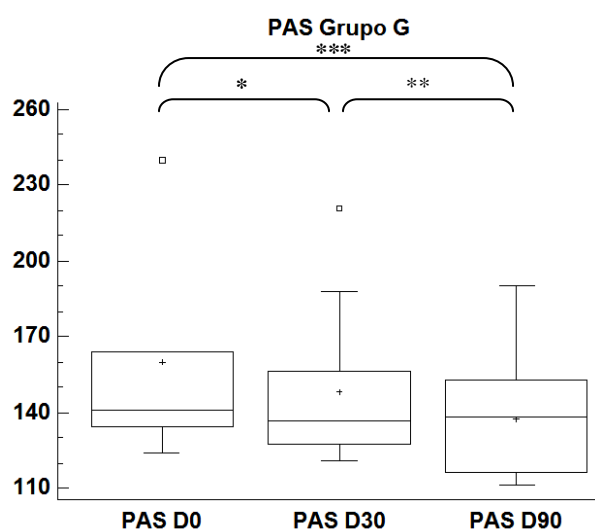


Figura 78: Presión arterial sistólica en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p descrito en el texto.

7.3.2.2.- Diagnóstico parasitológico e inmunológico:

A.- Proteinograma (Figura 79, 80, 81 y 82):

En el grupo G se observó un incremento estadísticamente significativo de la albúmina en los rangos de tiempo 0-30, 30-90 y 0-90. *p 0,0122; **p 0,0015; ***p 0,0010.

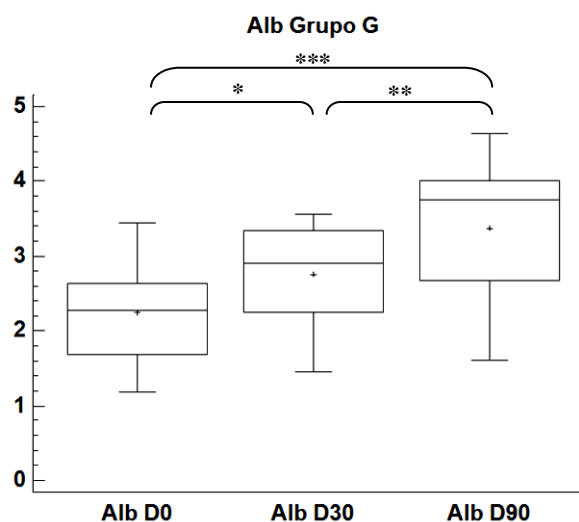


Figura 79: Albúmina en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p descrito en el texto.

En el grupo G se observó un aumento estadísticamente significativo del ratio albúmina/globulinas en todos los rangos de tiempo. *p 0,0093; **p 0,029; ***p 0,0010.

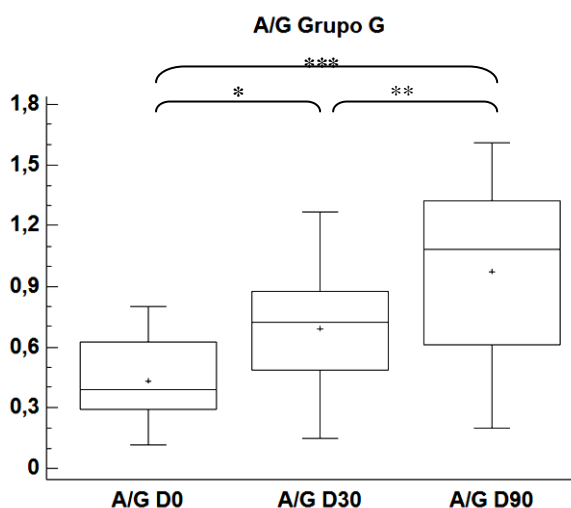


Figura 80: Ratio A/G en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p descrito en el texto.

En el grupo G se observó una reducción estadísticamente significativa de las globulinas totales en el rango de tiempo 0-90. *p 0,122; **p 0,0923; ***p 0,0010.

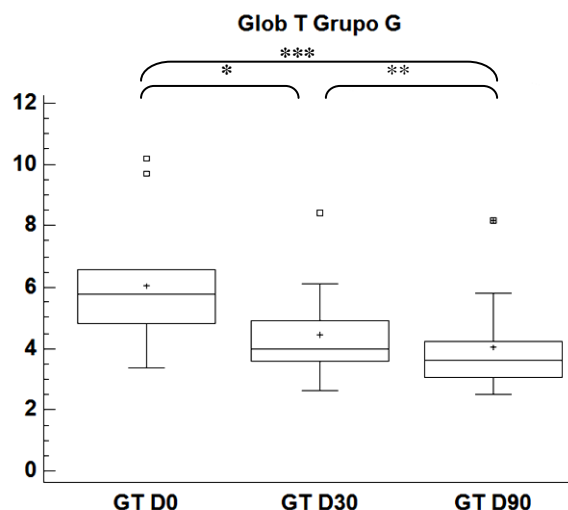


Figura 81: Globulinas totales en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p descrito en el texto.

En el grupo G se observó una reducción en las proteínas totales en los rangos de tiempo 0-30 y 0-90 pero no fue estadísticamente significativa. *p 0,0640; **p 0,8857; *** p 0,1230.

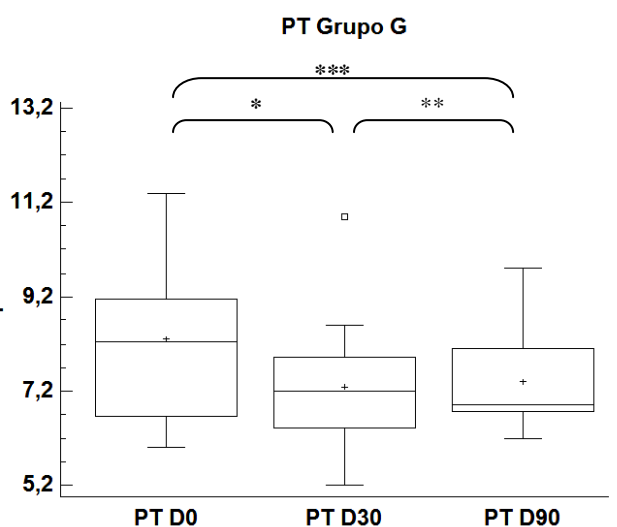


Figura 82: Proteínas totales en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p descrito en el texto.

7.3.2.3.- Parámetros hematológicos y bioquímicos:

A.- Hematología:

En el Grupo G se observó, en el rango de tiempo 0-90, un incremento no significativo de las plaquetas y de los glóbulos blancos; sin embargo se observó un incremento significativo del hematocrito (Tabla LXXII y Figura 83).

Tabla LXXII: Δ de los parámetros hematológicos por rangos de tiempo 0-90. Grupo G (significativo $p < 0,05$)

Rango 0-90		
	Δ promedio	***P
Hematocrito	8,95	0,0093
Plaquetas	83,50	0,3929
GB	-0,9	0,5693

En el Grupo G se observó un incremento estadísticamente significativo en el valor hematocrito en el rango de tiempo 0-90; *** p 0,0093 (Figura 83).

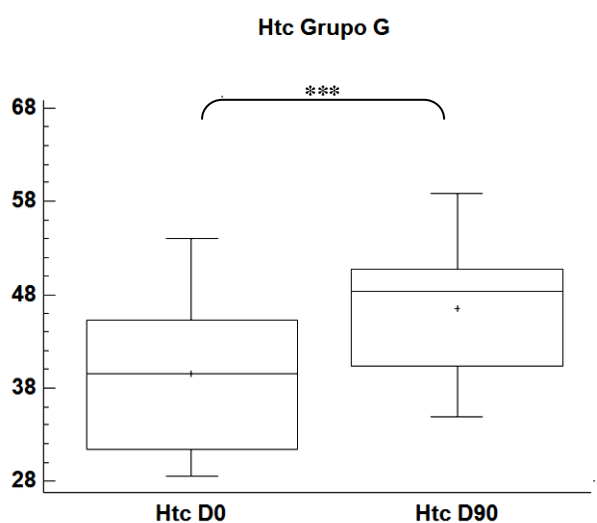


Figura 83: Hematocrito en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p descrito en el texto.

B.- Bioquímica:

En el grupo G se observó un incremento no significativo de la ALT y del Calcio total, en el rango de tiempo 0-90, aunque si hubo una reducción casi significativa de la urea y fósforo inorgánico (Tabla LXXIII, Figura 84 y 85).

Tabla LXXIII: Δ de los parámetros bioquímicos por rangos de tiempo 0-90. Grupo G (significativo $p < 0,05$)

Rango 0-90		
	Δ promedio	***p
ALT	7,5	0,1475
Urea	-10	0,0537
CaT	0,3	0,2578
P	-0,2	0,054

En el Grupo G se observó una reducción que fue casi estadísticamente significativa de la urea en el rango de tiempo 0-90;*** p 0,0537.

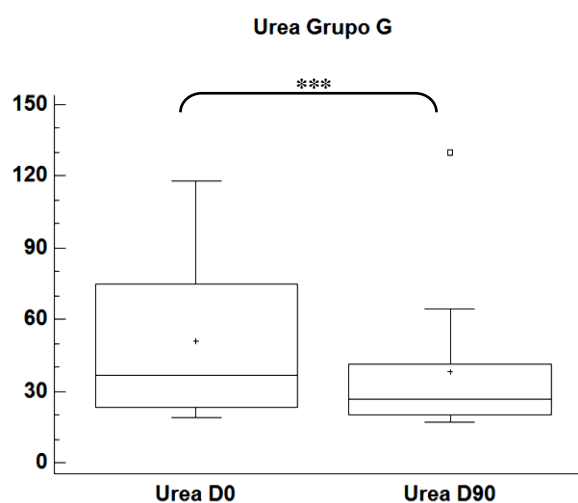


Figura 84: Urea en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p descrito en el texto.

En el grupo G se observó una reducción del fósforo que fue casi estadísticamente significativa en el rango de tiempo 0-90; *** p 0,054.

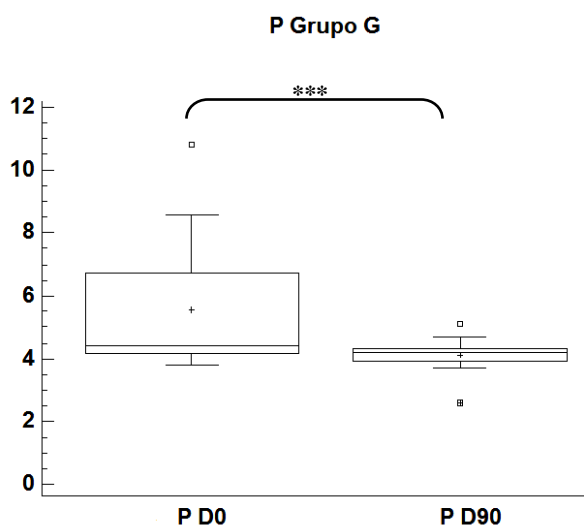


Figura 85: Fósforo inorgánico en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p descrito en el texto.

7.3.2.4.- Parámetros de función renal

A.-Tasa de filtración glomerular (TFG):

En el grupo G no se observó diferencia estadísticamente significativa en las TFG antes y después del tratamiento. *** p 0,7127 (Figura 86).

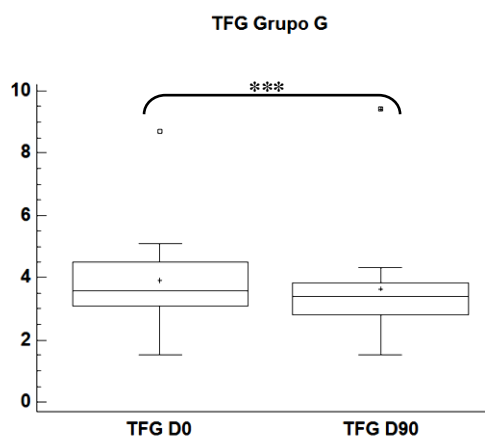


Figura 86: TFG Grupo G en D0 y D90. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras).

B.- Creatinina:

En el grupo G se produjo un incremento estadísticamente significativo de la creatinina en el rango de tiempo 0-30. Posteriormente la creatinina se redujo aunque este cambio no fue significativo. *p 0,0127 (Tabla LXXIV y Figura 87)

Tabla LXXIV: Δ de los parámetros bioquímicos por rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90. Grupo G, (significativo p<0,05)

	Rango 0-30		Rango 0-90		Rango 30-90	
	Δ promedio	*p	Δ promedio	***p	Δ promedio	**P
Creatinina	0,2	0,0127	0,08	0,0713	-0,12	0,1484

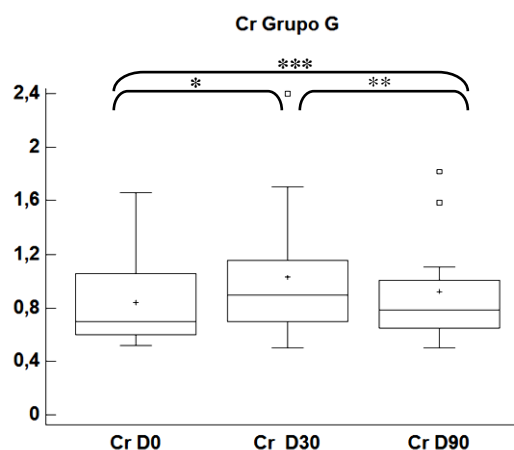


Figura 87: Creatinina en el Grupo G en D0, D30 y D90. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

B.-Ratio proteína/creatinina en orina (UPC):

En el Grupo G se observó una reducción estadísticamente significativa de la proteinuria en el rango de tiempo 0-90. *p 0.0537; **p 0.6719; ***p 0.0186 (Tabla LXXV y Figura 88)

Tabla LXXV: Δ del UPC por rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90. Grupo G (significativo p<0,05)

	Rango 0-30		Rango 0-90		Rango 30-90	
	Δ promedio	*p	Δ promedio	***p	Δ promedio	**p
UPC	-0,17	0,0537	-0,18	0,0186	-0,01	0,6719

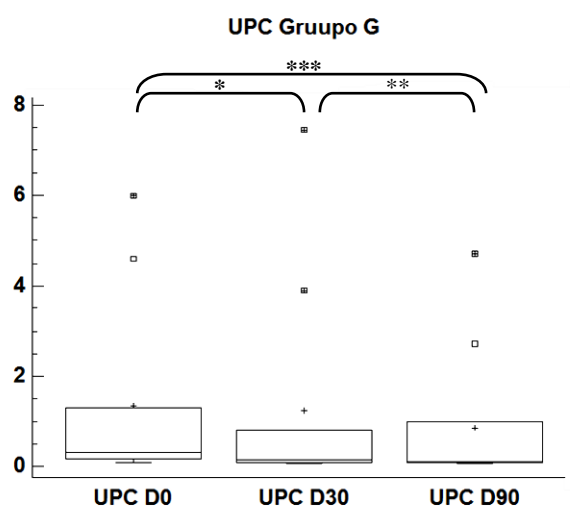


Figura 88: UPC en el Grupo G en D0, D30 y D90. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

C.- Densidad de la orina (DU):

En el grupo G no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la densidad de la orina a lo largo del tiempo.

D.- Electroforesis de proteínas en orina (SDS-PAGE):

En el Grupo G se observó desde el inicio al final del tratamiento un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de DO PAMP y una reducción del porcentaje de DO PBPM. Por otro lado, desde el final del tratamiento hasta la última revisión se observó una reducción estadísticamente significativa del porcentaje de DO PAMP y un incremento del porcentaje de DO PBPM (Tabla LXXVI y Figuras 89 y 90).

Tabla LXXVI: Δ del % D.O.PAMP y PBPM por rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90. Grupo G (significativo $p < 0,05$)

SDS-PAGE	Rango 0-30		Rango 0-90		Rango 30-90	
	Δ promedio	* p	Δ promedio	*** P	Δ promedio	** P
%D.O.PAMP	20	0,0244	11,75	0,3008	-8,2	0,0195
%D.O.PBPM	-20	0,0244	-11,75	0,3008	8,2	0,0195

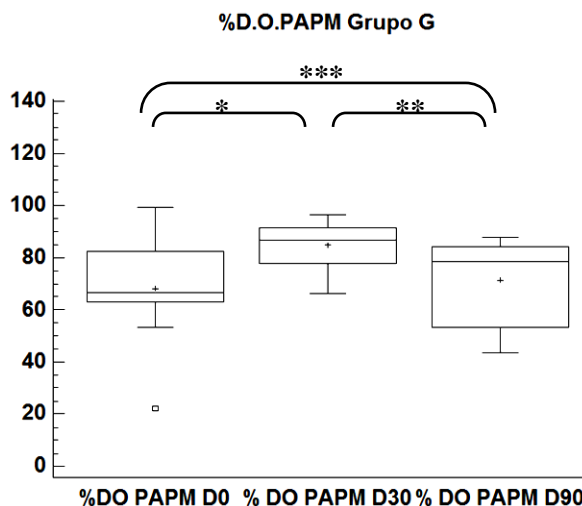


Figura 89: Incremento del porcentaje de D.O.PAMP por rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90 en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

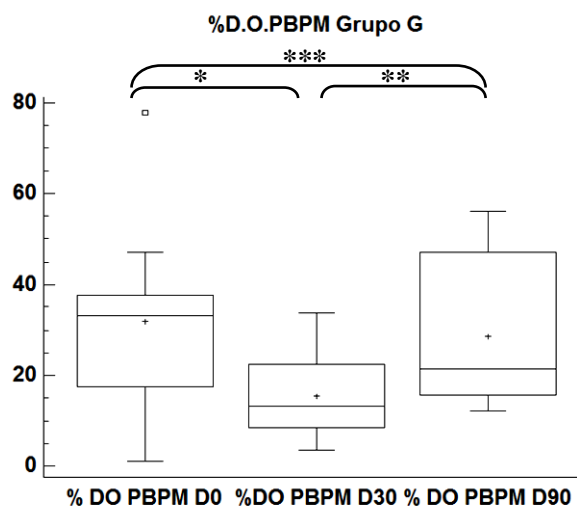


Figura 90: Incremento del porcentaje D.O.PBPM en el grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

7.3.2.5.- Proteínas de fase aguda (PFA):

En el grupo G se observó una reducción no significativa de la haptoglobina en todos los rangos de tiempo. Como se observa en la tabla el resto de las proteínas inflamatorias experimentaron un cambio significativo en los periodos de tiempo representados en las figuras (Tabla LXXVII y Figura 91, 92 y 93).

Tabla LXXVII: Δ Proteínas inflamatorias en los rangos de tiempo 0-30, 0-90, 30-0. Grupo G (significativo $p < 0,05$)

PFA	Rango 0-30		Rango 0-90		Rango 30-90	
	Δ promedio	*p	Δ promedio	***p	Δ promedio	**p
Prot.CR	-20,65	0.0156	-20,65	0,0078	0	0,5000
Hp	-0,37	0.9219	-0,34	0,3496	0,02	0,2754
FS	-583	0.0020	-609,5	0,0010	-26,5	0,0195
PON-1	1.1	0.0020	1,15	0,0005	0.05	0,0488

En los rangos de tiempo 0-30 y 0-90 se observó una reducción estadísticamente significativa de la Prot.CR *p 0.0156; *** p 0.0078.

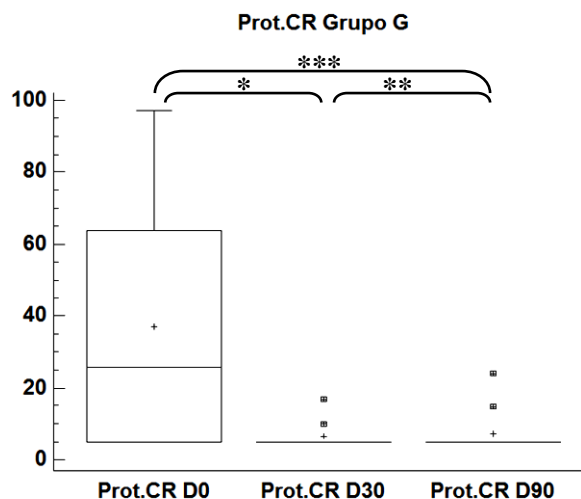


Figura 91: Prot.CR en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

En todos los rangos de tiempo se observó una reducción estadísticamente significativa de la Ferritina (FS) * p 0.0020; ** p 0.0195; *** p 0.0010

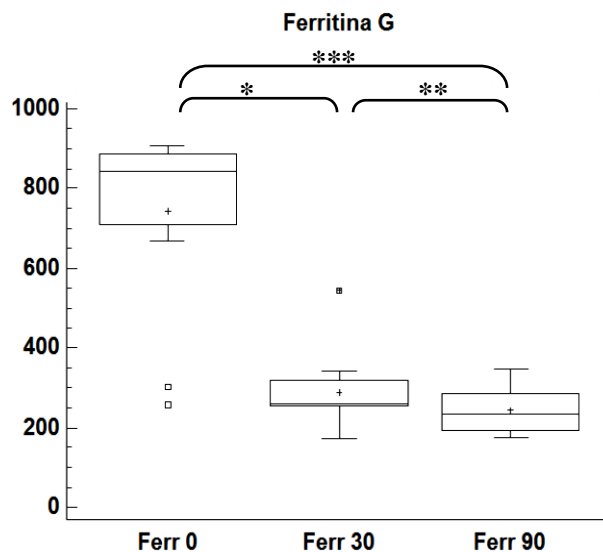


Figura 92: Ferritina en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

En todos los rangos de tiempo se observó un aumento estadísticamente significativo del PON-1
 *p 0.0020; **p 0.0488; *** p 0.0005.

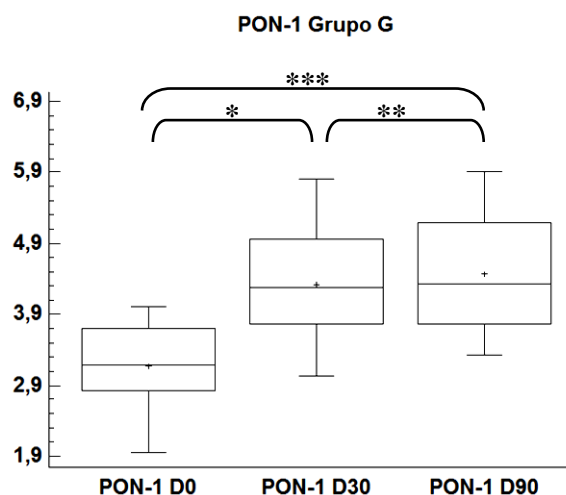


Figura 93: PON-1 en el Grupo G. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

7.3.3.- EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DEL GRUPO M

7.3.3.1.- Parámetros clínicos CE

A.- Puntuación clínica (PC):

En el Grupo M se observó una reducción estadísticamente significativa en la puntuación clínica desde el inicio al final del tratamiento. Lo mismo ocurrió desde el principio hasta el final del estudio, pero la reducción no fue significativa (Tabla LXXVIII y Figura 94).

Tabla LXXVIII: Δ promedio de la puntuación clínica por rangos de tiempo. Grupo M (significativo $p < 0,05$)

	Rango 0-30		Rango 0-90		Rango 30-90	
	Δ promedio	*p	Δ promedio	***P	Δ promedio	**p
PC	-7	p 0,0313	-8	p 0,0156	-1	P 0,3750

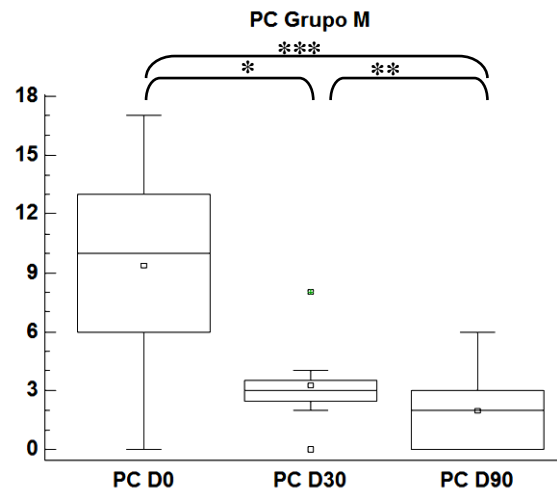


Figura 94: Puntuación clínica en el Grupo M. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

B.- Peso:

La miltefosina no produjo ningún efecto sobre el peso a lo largo del tiempo.

C.- Presión arterial sistólica (PAS):

En el grupo M no se observó ningún cambio estadísticamente significativo de las PAS en ningún rango de tiempo. *p 0,2969; **p 0,0859; ***p 0,4688 (Figura 95).

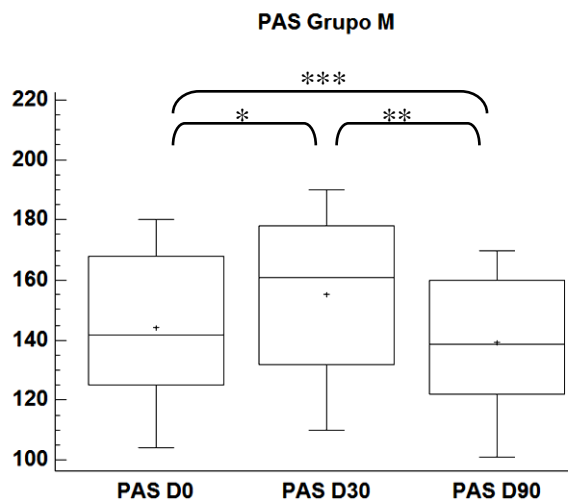


Figura 95: Presión arterial sistólica Grupo M. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p.

7.3.3.2.- Proteinograma:

En este grupo de tratamiento el incremento de albúmina no fue estadísticamente significativo en ningún rango de tiempo lo mismo se observó en la reducción de las globulinas totales y de las proteínas (Tabla LXXIX).

Tabla LXXIX: Δ de los parámetros por rangos de tiempo. Grupo M (significativo $p < 0,05$)

	Rango 0-30		Rango 0-90		Rango 30-90	
	Δ promedio	*p	Δ promedio	***p	Δ promedio	**p
Alb	0,48	0,1484	0,55	0,2500	0,07	0,5469
GlobT	-0,43	0,380	-0,5	0,3125	-0,07	0,7422
A/G	0,22	0,0156	0,16	0,2109	-0,06	0,8125
PT	-0,7	0,1094	-0,45	0,3281	0,25	0,1953

Sin embargo el incremento del ratio albúmina/globulinas fue estadísticamente significativo en el rango de tiempo 0-30. * p 0,0156; ** p 0,8125; *** p 0,2109 (Figura 96).

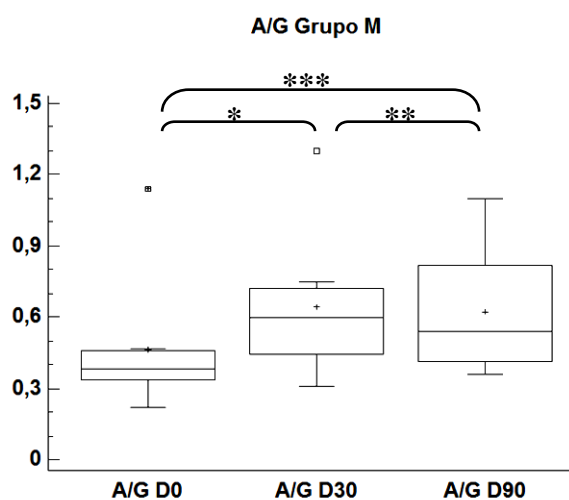


Figura 96: Ratio A/G en el Grupo M. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

7.3.3.3.- Parámetros hematológicos y bioquímicos

A.- Hematología:

En el grupo M se observó una reducción no significativa del hematocrito y de las plaquetas en el intervalo de tiempo 0-90 (Tabla LXXX)

Tabla LXXX: Δ de los parámetros hematológicos. Grupo M (significativo $p < 0,05$)

	Rango 0-90	
	Δ promedio	***p
Hematocrito	-0,25	0,3125
Plaquetas	-2,5	0,4626
GB	-2,39	0,0391

En el Grupo M se produjo una reducción estadísticamente significativa en el GB en el rango 0-90; *** p 0,0391 (Figura 97).

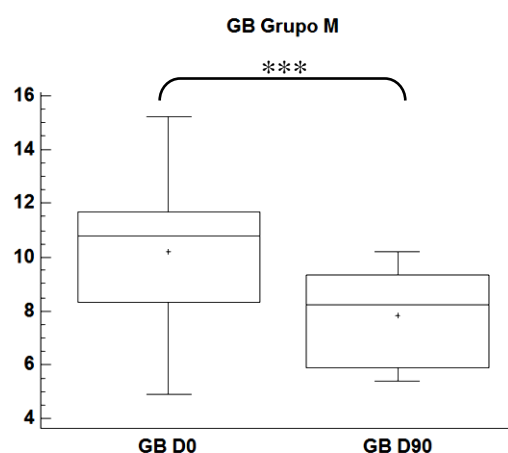


Figura 97: Recuento de glóbulos blancos en el Grupo M. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

B.- Bioquímica:

En el Grupo M se observó un aumento del Ca total y de la urea, además de una reducción de la ALT y del fósforo, en el intervalo de tiempo 0-90. Sin embargo, ninguno de estos cambios fueron estadísticamente significativos Tabla LXXXI.

Tabla LXXXI: Δ de los parámetros bioquímicos. Grupo M (significativo $p < 0,05$)

	Rango 0-90	
	Δ promedio	***p
ALT	-3,5	0,6094
Urea	11,5	0,6250
CaT	0,2	0,3984
Pinorg	-0,2	0,5625

7.3.3.4.- Parámetros de función renal:

A.- Tasa de filtración glomerular (TFG):

En el Grupo M no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en las TFG antes y después del tratamiento. *** p 0,0967 (Figura 98).

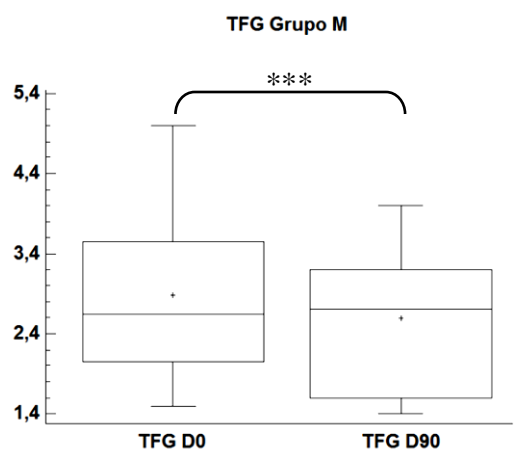


Figura 98: TFG en el Grupo M. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p.

B.- Creatinina

En el Grupo M se observó un aumento estadísticamente significativo de la creatinina desde el final del tratamiento (D30) hasta el final del estudio (D90) (Tabla LXXXII y Figura 99).

Tabla LXXXII: Δ de la creatina por rangos de tiempo 0-30, 0-90, 30-90. Grupo M (significativo $p < 0,05$)

	Rango 0-30		Rango 0-90		Rango 30-90	
	Δ promedio	*p	Δ promedio	***p	Δ promedio	**p
Cr	0,10	0,4688	0,45	0,0078	0,35	0,0313

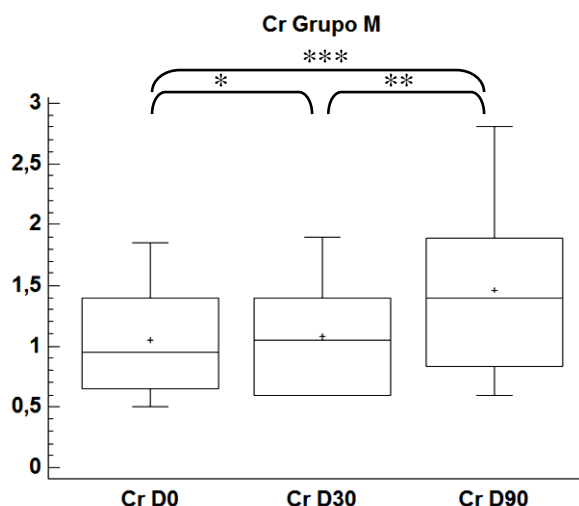


Figura 99: Creatinina en el Grupo M. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

B.- Ratio proteína/creatinina en orina (UPC):

En el Grupo M la reducción de la proteinuria no fue estadísticamente significativa en ningún intervalo de tiempo (Tabla LXXXIII).

Tabla LXXXIII: Δ del UPC por rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90. Grupo M (significativo $p < 0,05$)

	Rango 0-30		Rango 0-90		Rango 30-90	
	Δ promedio	*p	Δ promedio	***p	Δ promedio	**p
UPC	-1,15	0,1484	-1,68	0,1484	-0,53	0,1484

D.- Densidad de la orina (DU):

En el Grupo M no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la densidad de la orina a lo largo del tiempo.

D.- Electroforesis de proteína en orina (SDS-PAGE):

En el Grupo M no se observaron cambios estadísticamente significativos en ambos tipos de proteínas desde el inicio al final del tratamiento y desde éste último hasta la última revisión. Sin embargo a lo largo de todo el seguimiento (D0 a D90) el resultado final es un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de D.O. PAPM y una reducción del porcentaje de D.O. PBPM (Tabla LXXXIV, Figuras 100 y 101).

Tabla LXXXIV: Δ del porcentaje de D.O. PAM y PBPM por rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90. Grupo M (significativo $p < 0,05$)

	Rango 0-30		Rango 0-90		Rango 30-90	
	Δ promedio	*p	Δ promedio	***p	Δ promedio	**p
%D.O.PAM	12,5	0.2969	16,1	0.0313	3,6	0.2188
%D.O.PBPM	-12,5	0.2969	-16,1	0.0313	-3,6	0.2188

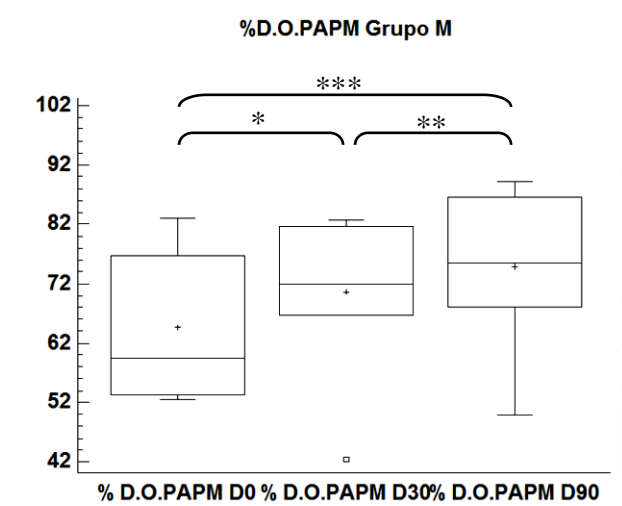


Figura 100: Porcentaje de D.O. PAM del Grupo M. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

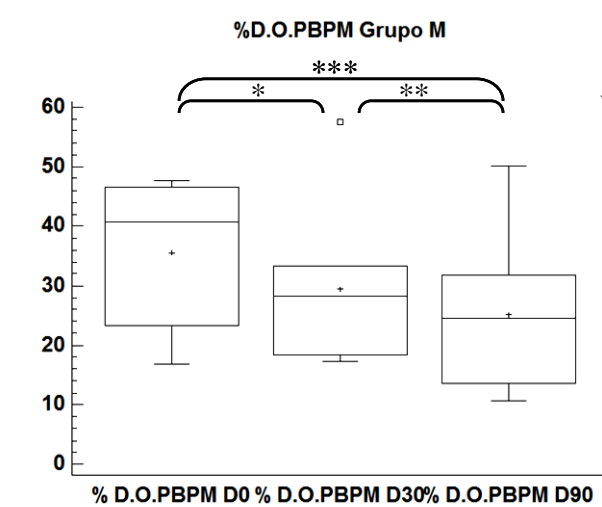


Figura 101: Porcentaje de D.O. PABM del Grupo M. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

7.3.3.5.- Proteínas de fase aguda (PFA)

En el caso de las proteínas inflamatorias ninguno de los cambios observados fueron estadísticamente significativos, salvo en la haptoglobina en la que la reducción fue significativa en el rango 0-90 (Tabla LXXXV, Figura 102).

Tabla LXXXV: Proteínas de fase aguda. Δ de los parámetros en los rangos de tiempo 0-30, 0-90 y 30-90. Grupo M (significativo $p < 0,05$)

	Rango 0-30		Rango 0-90		Rango 30-90	
	Δ promedio	*p	Δ promedio	***p	Δ promedio	**p
Prot.CR	-9,1	0,3125	-9,1	0,3750	0	1
Hp	0,01	0,4609	-0,66	0,0078	-0,67	0,2500
FS	-332,8	0,1953	-420	0,6406	-87,2	0,9453
PON-1	0,03	0,7422	0,02	0,8438	0	0,3281

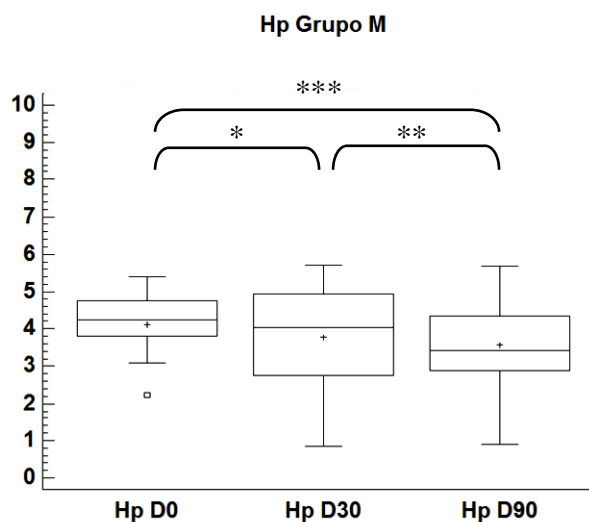


Figura 102: Hp en el Grupo M. La gráfica muestra la media (punto), mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). Los asteriscos muestran el valor de p reflejado en la tabla.

7.4.- ANALISIS DE CORRELACIÓN

La relación detallada de los análisis de correlación está reflejada en las tablas de los anexos. (XII, XIII, XIV, XV y XVI). Las correlaciones más representativas se describen y explican detalladamente en la discusión.

8.- DISCUSIÓN

8.- DISCUSION

Parámetros clínicos

Puntuación clínica (PC)

Como queda reflejado en la puntuación clínica (Anexos I, II, III y IV), todos los pacientes de este estudio presentaron signos clínicos asociados con Lcan, aunque la PC varió de unos a otros. Este hallazgo contrasta con lo descrito en el estudio de Paradies y cols (2010) en el que se afirmó que el 34.7 % de los pacientes tenían signos clínicos asociados con Lcan mientras que el 56.5% permaneció asintomático. Nosotros sólo hemos encontrado un paciente que fuera asintomático en el momento del diagnóstico. La ausencia de signos clínicos en algunos perros infectados que no progresan clínicamente refleja la inmunocompetencia individual diferente para controlar la infección (Cardoso y cols., 2007). En nuestra opinión esa individualidad inmunológica puede ser la causa de que la gravedad del cuadro clínico sea diferente en cada paciente.

Los pacientes de ambos grupos de tratamiento ganaron peso a lo largo del tiempo, sin que existieran diferencias significativas entre ambos.

A lo largo del estudio se observó una mejoría clínica, en ambos grupos de tratamiento, que fue significativa ya en la segunda visita del D30. No se observaron diferencias entre los grupos, ya que en ambos la puntuación clínica se redujo a lo largo del tiempo; sin embargo esta reducción no fue significativa en el Grupo M desde el final de tratamiento hasta el final del estudio (D30-D90). Esto contrasta con los datos de Manna y cols (2015) que describieron que en el grupo de pacientes tratados con antimoniales/alopurinol la mejoría clínica ocurrió rápidamente, a los 30 días del tratamiento, mientras que con el milteforán/ alopurinol la mejoría ocurrió a los 60 días del tratamiento.

Aunque algunos pacientes redujeron a cero su puntuación clínica, la mayoría mantuvieron algún signo clínico. En el caso del Grupo M 2/8 pacientes (25%) y en el Grupo G 4/12 (33%) se tornaron asintomáticos. Estos resultados están en la línea de lo descrito por Mateo y cols (2009) que encontraron una mejoría significativa de la puntuación clínica en ambos grupos a lo largo del estudio; de manera que al final la puntuación se redujo en un 51,1% en el Grupo M y en un 63,4% en el Grupo G sin diferencias significativas. Woerly y cols (2009) demostraron que el 20% de los pacientes tratados con milteforán mostró una remisión clínica completa (PC=0) mientras que casi la mitad de los perros presentó al menos una mejoría del 75%. Otros autores, sin embargo, encontraron una respuesta clínica mucho más evidente. Por ejemplo Torres y cols

(2011) describieron que un mes después del inicio del tratamiento con antimoniales 10/23 pacientes y a los 90 días 20/23 no tenían signos clínicos. También Manna y cols (2015) afirmaron que la mayoría de los pacientes quedaron libres de signos clínicos a los 90 días.

Torres y cols (2011) afirmaron que los perros que desarrollaron cuadros clínicos con carácter inmunomediado como por ejemplo poliartritis y uveítis, eran los que tenían títulos de anticuerpos más altos en el momento del diagnóstico. En nuestro trabajo hemos encontrado que el título IFI de los pacientes que presentaron manifestación articular osciló entre 1/800-1/1600, mientras que otros pacientes con títulos más altos, 1/6400, no presentaron este signo clínico. No hemos encontrado ningún paciente con uveítis, por lo tanto no podemos discutir este dato en relación al título de anticuerpos.

En relación a los efectos adversos relacionados con la administración de ambos fármacos, Mateo y cols (2009) no encontraron diferencias significativas en la aparición de efectos adversos entre los dos grupos, siendo el más frecuente en ambos la aparición de vómitos. Por otro lado Miró y cols (2009) expusieron que 2/36 perros tratados con antimonio de meglumina desarrollaron signos clínicos de astenia, pero no fue necesario la retirada del tratamiento. En nuestro trabajo uno de los pacientes del grupo tratado con antimoniales (G6) desarrolló signos clínicos de estibointoxicación, manifestada con azotemia y uremia antes de terminar el tratamiento. Este paciente necesitó hospitalización para tratar el cuadro de lesión renal aguda. Superada la crisis, una semana después, continuó tratamiento ambulatorio de ERC. Este paciente, como se comentará posteriormente, presentó un aumento de la tasa de filtración glomerular al final del periodo de seguimiento.

También en nuestro estudio encontramos en el Grupo M, dos pacientes que mostraron signos digestivos graves y no respondieron al tratamiento habitual (antieméticos y protectores digestivos). Por ello se decidió suspender la administración del fármaco y un mes después se pasaron al grupo G (G9 y G11).

En este estudio no hemos encontrado una correlación entre la puntuación clínica y el título de anticuerpos, Mateo y cols (2009) tampoco encontraron correlación entre el porcentaje de descenso del título de IFI y el descenso de la puntuación clínica. Pero sin embargo Manna y cols (2015) demostraron que existía una correlación positiva entre la puntuación clínica y el título de anticuerpos. En nuestro estudio no se ha encontrado esta correlación aunque si se ha confirmado una correlación positiva entre la PC y las globulinas totales en la última visita en ambos grupos. Es decir, a menor respuesta humoral, menor puntuación clínica y por lo tanto mejor estado clínico.

En el estudio de eficacia terapéutica comparativo (antomoniales vs miltefosina) realizado por Mateo y cols (2009), en el que se realizó el seguimiento de los pacientes durante 6 semanas postratamiento, no encontraron correlación entre el IFI y la mejoría clínica observada, coincidiendo así con la mayoría de los autores en que el IFI no refleja la evolución clínica de los pacientes tratados (Solano-Gallego y cols., 2001; Pennisi y cols 2005). En nuestro estudio, el seguimiento de los pacientes se realizó durante dos semanas más que en el estudio de Mateo y cols (2009) y tampoco encontramos esta correlación ya que la mejoría clínica fue evidente al finalizar el tratamiento, y como hemos comentado anteriormente, sólo 11/20 redujeron el título de anticuerpos dos meses después.

Nuestros resultados por lo tanto coinciden con la mayoría de los autores que afirman que en los primeros meses de tratamiento la serología es poco útil en el seguimiento de los pacientes porque el descenso del título de anticuerpos es más lento que la mejoría clínica. Sin embargo, la serología sí parece ser más útil en la evaluación de las recidivas, porque van asociadas a un aumento del título de anticuerpos (Torres y cols., 2011).

En la visita del día 30 en el grupo G se encontró una correlación negativa entre la PC y la albúmina. En este caso el empeoramiento del estado clínico, y por lo tanto la mayor puntuación clínica, puede predecir los valores bajos de albúmina posiblemente causados tanto por la inflamación como por la pérdida de proteínas por la orina.

También en la primera visita se encontró una correlación positiva entre el UPC y la puntuación clínica. Esta correlación se mantuvo en el Grupo G en la visita del día 30. Es muy complicado establecer si en este momento la correlación es debida únicamente a una lesión renal, máxime cuando los parámetros incluidos en la puntuación clínica pueden estar producidos por cualquier enfermedad inflamatoria crónica sistémica (astenia, anorexia, palidez de mucosas, vómitos, diarreas etc..).

Según estos resultados a mayor UPC, mayor puntuación y peor estado clínico. En etapas iniciales de ERC asociada a un proceso infeccioso, la proteinuria puede ocurrir debida a la pérdida de permeabilidad de los capilares glomerulares por el depósito de IC e inflamación vascular (Lees y cols., 2005). Pero es un hecho que, aunque en etapas iniciales de ERC podamos encontrar pacientes con proteinuria y sin signos clínicos, la proteinuria sostenida es perjudicial, contribuye a la progresión de la enfermedad renal y a los signos clínicos relacionados con la ERC. De manera que en estadios finales de ERC, y debido a la glomeruloescleroris, normalmente encontramos una reducción del UPC junto con un aumento de la creatinina (y por lo tanto de la azotemia), lo cual se debe interpretar como un empeoramiento de la funcionalidad renal (Lees y cols., 2005) y posiblemente del estado clínico

(mayor puntuación clínica). Por lo tanto esta correlación positiva solo la podemos explicar en estadios iniciales de la enfermedad de ERC, como es el caso de la mayoría de nuestros pacientes clasificados en riesgo o en IRIS I, porque en estadios finales la correlación debería ser negativa. Además en etapas iniciales el peor estado clínico posiblemente se debería interpretar como la consecuencia de la parasitosis y no tanto de la enfermedad renal.

En la visita del día 30 en el Grupo G se encontró una correlación positiva de la puntuación clínica con la Prot. C reactiva, lo cual enfatiza el posible uso de las PFA en la monitorización del tratamiento de los pacientes con Lcan ya que se pueden normalizar antes que los marcadores empleados tradicionalmente como la tasa de anticuerpos y electroforesis de proteínas plasmáticas (Martinez-Subiela y cols., 2011).

Presión arterial

La prevalencia de la hipertensión en el momento de la recepción de los pacientes fue del 42%, superior a los resultados obtenidos por Tozzi Braga y cols (2015) (28,8%) y más baja que los resultados de Cordadellas y cols (2006) (61,5%). Los primeros atribuyeron la diferencia entre sus resultados y los de Cortadellas, a que en su estudio se monitorizó la presión arterial tres veces al día en dos días consecutivos, minimizando de esta manera la hipertensión por *bata blanca*. En nuestro estudio la presión se monitorizó siguiendo las guías del consenso ACVIM 2007 (Brown y cols., 2007).

No se empleó exactamente el mismo método de medida en todos los pacientes debido a varias razones relacionadas con el animal. Por un lado, por la imposibilidad de obtener medidas con el método oscilométrico en los de talla pequeña y en algunos animales que presentaban temblores durante las mediciones. Sin embargo en cada paciente se estandarizó la medida de manera que siempre se utilizó el mismo tamaño de manguito correspondiente al 40% del diámetro de la extremidad, que se colocó siempre en la misma extremidad y se posicionó al paciente siempre en el mismo decúbito, siendo medidas además siempre por el mismo operador. Todo ello nos permitió obtener lecturas reproducibles y comparables.

En el presente estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las presiones sistémicas entre los grupos ni en el momento de las visitas ni en el incremento en los rangos de tiempo. En los dos grupos la presión sistólica se redujo a la largo del tiempo (salvo en el Grupo M en el que se produjo un ligero incremento no significativo en el intervalo 0-30). Sin embargo la reducción de la presión sólo fue estadísticamente significativa en el Grupo G en el rango de tiempo 0-90.

En relación a la lesión que produce la hipertensión arterial sobre los órganos diana un paciente efectivamente presentó ceguera debido a degeneración retiniana (G3), muy probablemente provocada por la hipertensión mantenida.

Las lesiones oculares son frecuentes en perros hipertensos, existiendo un riesgo sustancial para su aparición con presiones arteriales sistólicas superiores a 180 mmHg (Litman y cols., 1988). Este síndrome se conoce como "retinopatía hipertensiva" o coroidopatía, siendo las lesiones más frecuentes que podemos encontrar el desprendimiento de retina, hemorragia retiniana y vítrea, papiledema, glaucoma y degeneración retiniana como secuela última. El pronóstico es muy pobre ya que incluso con tratamiento antihipertensor la recuperación de la visión sólo ocurre en una minoría de los casos (Maggio y cols., 2000). El paciente de nuestro estudio (G3), no recuperó la visión aún después de alcanzar presiones arteriales sistólicas normales.

La hipertensión arterial puede ocurrir en cualquier fase de ERC, no estando relacionada con la creatinina (Michell y cols., 1997). De hecho, en el consenso IRIS, se clasifica a los pacientes en diferentes estadios en función del valor de creatinina y cada estadio se subclasifica en función de la presión arterial y de la proteinuria. En nuestro estudio no encontramos ninguna correlación entre la creatinina y la presión arterial en los pacientes analizados.

La proteinuria se ha relacionado directamente con el incremento de la presión arterial y con el descenso de la TFG (Finco., 2004). Más recientemente, el estudio de Tozzi Braga y cols (2015) demostraron una correlación positiva y significativa entre la elevación de la presión arterial sistólica y el aumento del UPC en paciente positivos a Lcan. Sin embargo no pudieron correlacionar la severidad de la lesión glomerular con el grado de elevación de la presión arterial. Cortadellas y cols (2008) encontraron una correlación positiva entre la presión sistólica y la microalbuminuria, la creatinina plasmática y el UPC, lo que indica un posible papel de la hipertensión sistémica en la progresión de la enfermedad renal secundario a la leishmaniosis.

A pesar de los resultados descritos en la bibliografía, en nuestro estudio sólo encontramos una correlación positiva entre la presión arterial sistólica y la proteinuria en la visita 30 del grupo M. Quizá en estos pacientes la falta de control de la nefropatía proteinúrica, como se comentará posteriormente, lleve a un incremento de la presión arterial en este rango de tiempo.

Diagnóstico parasitológico e inmunológico

IFI y electroforesis de proteínas plasmáticas

En el Grupo G, 8/12 (66,6%) y en el Grupo M, 3/8 (37,5%) pacientes mostraron una dilución de dos títulos en el IFI a los 60 días de terminar el tratamiento, aunque no hubo diferencias entre los dos grupos en el número de pacientes en los que se observó este cambio.

En un estudio en el que se aplicó tratamiento con antimoniales, Torres y cols (2011) describieron una reducción del título de anticuerpos a los 180 días del inicio del tratamiento, aunque los pacientes seguían siendo claramente positivos; un año después sólo 4/23 fueron negativos y 19/23 se mantuvieron seropositivos post tratamiento posiblemente debido a la respuesta individual.

En nuestro estudio encontramos una gran variedad inter-individual, ya que en el día 90 post inicio de tratamiento 11/20 pacientes redujeron el título de anticuerpos dos diluciones pero se mantuvieron seropositivos (solamente 1 se tornó negativo), 1/20 redujo el título pero no llegó a reducir dos títulos que es lo que consideramos como una reducción significativa, en 5/20 el título no se modificó y en 3/20 aumentó el título de anticuerpos (dos de ellos pertenecientes al Grupo M). Es decir posiblemente se deba a que nuestro periodo de estudio (90 días) es demasiado corto para poder observar un cambio claro en el título de anticuerpos en todos los pacientes.

Por otro lado Solano Gallego y cols (2001) y Alvar y cols (2004) afirmaron que el aclaramiento del parásito después del tratamiento es un hecho raro pero posible. Nosotros hemos observado que un paciente se tornó seronegativo (M1) y otros redujeron los títulos al límite de detección (G7 y M4).

En el trabajo de Mateo y cols (2009) encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos al final del tratamiento en las proteínas plasmáticas totales y en el cociente albúmina/globulinas, pero no encontraron diferencias en la evolución de la titulación de anticuerpos a lo largo del tiempo entre los dos grupos.

En nuestro trabajo no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento en ninguna de las tres visitas respecto al cociente A/G, a excepción de la última visita en la que se evidenció un aumento casi significativo ($p=0.0697$) que probablemente podría haber llegado a ser significativo con una muestra más grande o con una probabilidad del 90% en vez del 95%. Sin embargo sí encontramos una diferencia significativa en el incremento promedio del cociente albúmina/globulinas en el rango de tiempo 30-90 y 0-90.

En el Grupo G se observó un incremento estadísticamente significativo de la albúmina y del cociente albúmina/globulinas en todos los rangos de tiempo y una reducción significativa de las globulinas totales desde el inicio hasta al final del estudio.

En el Grupo M se produjeron los mismos cambios que en el Grupo G pero no llegaron a ser estadísticamente significativos, salvo para el incremento del cociente albúmina/ globulinas al final del tratamiento. También Woerly y cols (2009) encontraron diferencias significativas desde el inicio al final del tratamiento en la albúmina y el cociente albúmina/globulinas, nosotros coincidimos con este trabajo en relación al cociente albúmina/globulinas.

Todo lo anteriormente expuesto demuestra que los antimoniales son más efectivos que la miltefosina en la corrección del proteinograma, al menos en los intervalos de tiempo que hemos valorado de tres meses.

En el estudio de Torres y cols (2011), en pacientes tratados con antimoniales, observaron una normalización de las proteínas totales en el día 90 post-tratamiento, debido fundamentalmente al descenso de las gamma globulinas. Esta normalización se correlacionó con una mejoría de los signos clínicos. En nuestro estudio la reducción de de las proteínas totales en el Grupo G se produjo en el día 30, a costa de una reducción en las globulinas totales que fue significativa a lo largo de todo el periodo de estudio. Nosotros coincidimos con estos autores en la correlación positiva entre la puntuación clínica y las globulinas totales. En cualquier caso la normalización del proteinograma no fue completa en todos los pacientes al final del seguimiento.

A pesar de lo anteriormente expuesto en el estudio de Martínez-Subiela y cols (2011) afirmaron que la monitorización de las inmunoglobulinas durante el tratamiento es una herramienta poco útil para valorar la respuesta si la infección no se ha eliminado y no se ha producido una cura parasitológica. Esto podría explicar por qué pacientes que se tornan asintomáticos muestran patrones electroforéticos alterados y hace muy complicado decidir cuándo retirar el tratamiento. Todo ello refuerza la necesidad de encontrar otros marcadores para monitorizar la respuesta y predecir posibles recidivas. En concreto, los autores citados afirman que la monitorización de las PFA puede ser de gran ayuda.

En la primera visita se encontró una correlación positiva del título de IFI con las globulinas y las proteínas totales, y negativa con el cociente albúmina/globulina, lo cual es lógico al deberse muy probablemente a un aumento de las gammaglobulinas.

En D0 se encontró una correlación significativa del cociente A/G, que fue positiva en el caso de la albúmina y negativa en el caso de las globulinas. Es decir, debido al proceso inflamatorio y a

la pérdida de proteínas por la orina, la albúmina se reduce y por consiguiente también lo hará el cociente A/G; y como consecuencia de la respuesta humoral, el aumento de globulinas totales reducirá el cociente. Como el aumento de las proteínas totales suele ser debido al aumento de globulinas, como lo demuestra la correlación positiva encontrada en D0, en la visita 30 del Grupo G y en ambos grupos en la visita D90, a medida que aumentan las proteínas totales se reduce el cociente.

También en la primera visita se encontró una correlación negativa entre las globulinas totales y la presión arterial sistólica, pudiendo querer decir que los pacientes con mayor respuesta humoral, y por lo tanto más enfermos, presentan una menor resistencia vascular periférica. Sin embargo para poder afirmar esta relación necesitaríamos contar con la frecuencia cardíaca y los datos de la exploración física que nos aportaran información acerca de la volemia del paciente y de la resistencia vascular periférica, ya que la presión arterial depende de estos tres factores.

Finalmente, en la última visita, en el Grupo G se encontró una correlación negativa entre la albúmina y las globulinas totales. Es decir, a medida que aumenta la respuesta humoral, la albúmina como proteína inflamatoria aguda negativa se reduce.

Diagnóstico molecular: PCR y qPCR.

En general los pacientes que tuvieron una PCR anidada positiva en médula en la primera visita, se mantuvieron positivos al final del estudio, excepto un paciente (G4) que se tornó de negativo en D0 a positivo en D90. Este hecho puede explicarse en el caso de que en la primera muestra de médula no se tomara ADN del parásito. Por otro lado aunque la determinación de la carga parasitaria no se pudo llevar a cabo en todos los pacientes, en los casos en los que determinó se demostró una reducción de la misma desde D0 a D90 en ambos grupos. En un estudio futuro se valorará si existen diferencias entre grupos y la significación de esta reducción.

Manna y cols (2015) observaron una reducción de la carga parasitaria un mes después del tratamiento con antimoniales y un descenso lineal en los siguientes nueve meses. Sin embargo los pacientes que recibieron miltefosina mostraron una gran variabilidad dentro del grupo. Aunque la carga parasitaria en ambos grupos fue similar a los tres meses, a los 24 meses la tendencia en ambos grupos fue distinta; de manera que el número de parásitos fue mayor en el Grupo Miltefosina que en el Grupo Glucantime, aunque no estadísticamente significativa.

En ninguno de los pacientes del estudio se logró demostrar la presencia de ADN del parásito en orina ni antes ni después del tratamiento. Diversos autores han descrito la presencia de *L. infantum* en la orina de perros con infección natural (Franceschi y cols., 2007; Solano-Gallego y

cols., 2007; Manna y cols., 2008) aunque la carga parasitaria fue menor que en médula ósea, linfonódulo y sangre periférica. Hernández y cols (2015), en su trabajo llevado a cabo en ocho beagles con infección experimental, encontraron que en el día 360 de seguimiento 6/8 perros mostraron una carga parasitaria baja atribuyendo este hecho a que en su estudio, a diferencia de los anteriormente mencionados, la mayoría de los pacientes no tenían signos de enfermedad renal (UPC>1). Manna y cols (2008) y Solano-Gallego y cols (2007) correlacionaron la enfermedad renal con la presencia de ADN de *Leishmania* en orina mediante qPCR, sin embargo Francesqui y cols (2007) no encontraron dicha correlación empleando qPCR. En nuestro estudio el 60% de la población mostró proteinuria por encima del rango de referencia (UPC >0,5) y el 50% por encima de 1. Incluso en estos últimos pacientes con UPC más altas no se logró demostrar la presencia de ADN del parásito en la orina. Por todo ello podemos concluir que la orina no es un buen sustrato para el diagnóstico de Lcan.

Parámetros hematológicos y bioquímicos:

A.- Hemograma:

La alteración más frecuente encontrada en el hemograma de los pacientes incluidos en este estudio fue la anemia 8/20 (40%) valorada en relación al valor del hematocrito.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratamiento en relación a los parámetros analizados (Htc, plaquetas y GB) en ninguna de las tres visitas, salvo en el valor Htc en el último chequeo y en el incremento de dicho parámetro desde el inicio hasta el final del estudio.

En el Grupo G se observó un incremento estadísticamente significativo en el Htc y en el Grupo M se redujo aunque de manera no significativa. En el Grupo G el 8,3% de los pacientes permanecieron anémicos al final del estudio, mientras que en el Grupo M no varió el porcentaje respecto al inicio del tratamiento; por lo tanto no coincidimos con Woerly y cols (2009) que afirmaron que en los perros tratados con miltefosina el número de pacientes con alteraciones hematológicas se redujo sustancialmente. En nuestro estudio, los antimoniales fueron claramente superiores a la Miltefosina en cuanto a la corrección de la anemia.

La enfermedad inflamatoria generalmente da lugar a una anemia debida a cambios en la homeostasis del hierro, alteración en la proliferación de progenitores eritroides y producción de eritropoyetina y descenso de la vida media de los glóbulos rojos (Weiss y Goodnough., 2005). La estimulación de los linfocitos T y de los monocitos, inducen la producción de citoquinas que a su vez estimulan la producción de proteínas de fase aguda en el hígado (Eddison y cols., 2008).

Como resultado de la síntesis de estas proteínas se produce una inhibición de la absorción duodenal de hierro, descenso de la liberación de hierro de los depósitos de los macrófagos y hepatocitos, aumento de la recaptación y retención de hierro celular (Tilg y cols., 2002). Finalmente hay una limitación en la disponibilidad de hierro para realizar la eritropoyesis (MacCown y Specht., 2001) lo cual contribuye a la anemia.

Más concretamente los pacientes con Lcan suelen presentar anemia debido un descenso del hierro sérico, de la capacidad de unión al hierro, de la capacidad de unión al hierro no saturado, del porcentaje de saturación de la transferrina y un aumento de la FS. En estos pacientes el aumento de Prot. CR se correlaciona negativamente con el hierro y positivamente con la FS (Silvestrini y cols., 2014). En nuestros pacientes podemos confirmar el papel de la inflamación en la anemia debido a la correlación positiva encontrada en la primera visita entre el hematocrito con el PON-1 y negativa con la FS.

Sin embargo la inflamación no explica completamente las alteraciones del hierro y se piensa que la depleción del mismo se puede deber también a su consumo por parte del parásito durante su crecimiento o al secuestro por el organismo para evitar la supervivencia del parásito. Por otro lado, también puede contribuir a la anemia en estos pacientes el sangrado crónico, epístaxis, lesiones cutáneas y úlceras digestivas secundarias a la azotemia (Silvestrini y cols., 2014).

Los reticulocitos son un índice temprano de la anemia por deficiencia de hierro tanto en perros como en personas y sus índices se pueden alterar durante el curso del proceso inflamatorio antes que los índices relacionados con las células rojas maduras. Meléndez-Lázaro y cols (2015) en un estudio realizado en pacientes con procesos inflamatorios de diferente etiología (con y sin anemia), encontraron que los pacientes con valores más elevados de Prot.CR tenían una menor cantidad de hemoglobina en los reticulocitos además de un mayor porcentaje de reticulocitos con niveles bajos de hemoglobina. Sin embargo no encontró correlación entre la FS y los mismos parámetros valorados en los reticulocitos.

En la última visita del Grupo G se encontró una correlación negativa entre el hematocrito y la puntuación clínica, es decir, un aumento de los signos clínicos parece ser indicativo de anemia.

También en la visita del día 90 en el Grupo G se detectó una correlación positiva del hematocrito con la albúmina y con el cociente albúmina/ globulinas, y negativa con las globulinas totales. Es decir una mayor respuesta inflamatoria y/o humoral puede predecir la anemia.

En el Grupo M se produjo una reducción estadísticamente significativa de los GB en el rango de tiempo 0-90. En general en este grupo se produjo una reducción de todos los parámetros hematológicos valorados, aunque la media del grupo se mantuvo dentro de los rangos de referencia salvo en el caso del hematocrito. Además en este rango de tiempo se encontró una correlación positiva entre los GB y las plaquetas. Para poder valorar la evolución de estos parámetros en estos pacientes sería necesario comparar los cambios en sangre periférica con un estudio de médula ósea para poder estudiar si son debidos a una reducción en el número de precursores.

B.- Perfil bioquímico:

No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en los valores de ALT ni de urea.

Aunque en el Grupo G se produjo un incremento de la ALT y en el Grupo M una reducción, ambos cambios no fueron significativos. El incremento de la ALT en el Grupo G se produjo en tres pacientes (G3, G4 y G5) y no se asoció con enfermedad. Estos resultados concuerdan con los descritos por Ikeda-García y cols (2007) que encontraron un incremento de las enzimas hepáticas (ALT, AST y fosfatasa alcalina) en el día treinta, en dos de los ocho pacientes que recibieron tratamiento con antimoniales. Para poder tener un diagnóstico más preciso deberíamos poder contar con el resto del perfil hepático, pero el hecho de encontrar una elevación en la ALT en el Grupo G y no en el Grupo M podría confirmar el posible efecto hepatotóxico de los antimoniales de acuerdo con lo descrito por Davidson (1998), quien afirmó que uno de los posibles efectos adversos de este principio activo se debía a una elevación reversible de las enzimas hepáticas. Aunque existen discrepancias entre diferentes autores con respecto al metabolismo de la miltefosina, Berman (2005) afirma que se metaboliza lentamente en el hígado y Bianciardi y cols (2009) que no existe una primera ruta de metabolización hepática; lo que parece claro es que, de acuerdo con Sundar (2001), el hígado no es posiblemente un órgano diana en la toxicidad de este fármaco.

En el caso de la urea se produjo una reducción significativa en el Grupo G y un aumento no significativo en el Grupo M en el rango de tiempo 0-90. Estos cambios no los podemos atribuir a la dieta porque el número de pacientes que necesitaron tomar una dieta renal fueron los mismos en ambos grupos. Quizá este cambio en la urea en el Grupo M sea de origen prerrenal o quizás, acompañado por el aumento significativo de la creatinina en este rango como se verá posteriormente, pueda ser debido a un empeoramiento de la funcionalidad renal que aún no se ve reflejado en la alteración de la filtración.

En la primera visita encontramos una correlación positiva entre la urea y el UPC. Esto se explica porque el descenso de funcionalidad renal, y por lo tanto la retención de toxinas urémicas, pondrá en marcha unos mecanismos adaptativos orientados a aumentar la filtración y que al aumentar la presión intraglomerular favorecen la proteinuria (Chew, 2011).

Calcio y Fósforo

Aunque nueve pacientes presentaron valores de calcio total por debajo del valor de referencia (9,1 mg/dl) y todos ellos presentaban albúminas por debajo del rango inferior, no se realizó el ajuste del calcio total (CaT). Se decidió no realizar el ajuste porque actualmente se considera que el CaT es 100% sensible para detectar la hipocalcemia. Además, el CaT ajustado con la albúmina o con las proteínas puede dar lugar a una sobreestimación de la normocalcemia o a una infraestimación de la hipocalcemia (Sharp y cols., 2009).

En la primera visita cuatro pacientes presentaron un valor de fósforo sérico por encima del rango de referencia (G4, G5, G11 y M2). Como se comentará posteriormente, el paciente G4 presentó hiperfiltración y el G11, aunque presentó una TFG en el límite inferior en la primera visita, posteriormente se redujo por debajo del límite inferior.

En el Grupo G se observó una reducción significativa de la concentración sérica de fósforo; probablemente porque en este grupo había más pacientes hiperfosfatémicos en los que se instauró una dieta renal específica.

Tanto el caso G5 como el M2 no tenían azotemia (creatinina 1,2 vs 0,6 mg/dl). El caso G5 no tenía proteinuria (UPC 0,09) y el caso M2 tenía un UPC 6,2. Cortadellas y cols (2009) describieron una incidencia de la hiperfosfatemia del 11,8% en pacientes clasificados en estadio 1B (creatinina <1,5 mg/dl y UPC>0,5, caso M2), mientras que en los pacientes en estadio 0 (creatinina <1,5 mg/dl y UPC<0,2, caso G5) el valor de fósforo se mantuvo dentro del rango de referencia. Coincidiendo con Cortadellas y cols (2009), nuestro paciente M2 confirmaría que los niveles de fósforo tienen que monitorizarse ya desde estadios muy tempranos de la ERC. En el caso G5 hubiera sido necesario valorar su metabolismo mineral para comprobar que no tuviera otras alteraciones por ejemplo un descenso del calcio ionizado y del calcitriol o un aumento de la PTH.

El producto Ca-P fue superior a 70 mg/dl en G4, G5 y G11. Tras la administración de una dieta renal el producto se corrigió en todos los pacientes.

Cortadellas y cols (2009) encontraron una correlación positiva entre la creatinina plasmática, la urea y el UPC. En nuestro trabajo hemos encontrado una correlación positiva entre la urea y la

creatina en la visita del día 90 en el grupo M. Esto es normal en presencia de lesión renal, ya que la reducción de su función excretora produce el acúmulo de sustancias tóxicas que contribuyen al síndrome urémico (Chew., 2011)

Parámetros de funcionalidad renal

TFG

Para interpretar el resultado del aclaramiento de creatinina exógena se tomaron los valores de referencia publicados por Royal canin 2-4,5 ml/kg/min (Waltham Focus., 2005).

En base a estos valores se detectó hiperfiltración en cuatro pacientes (20%) en el momento del diagnóstico, tres de los cuales se incluyeron posteriormente en el Grupo G (G3, G4, G9) y uno en el Grupo M (M1). Todos se mantuvieron en el rango no azotémico (creatinina <1,4 mg/dl) durante todo el tiempo del estudio y terminado el tratamiento recuperaron los valores normales de filtración. Por otro lado en el momento del diagnóstico, cuatro pacientes presentaron reducción de la TFG: G12, M3 y M4.

Cortadellas y cols describieron en 2008 que algunos pacientes con Lcan proteinúricos y no azotémicos, o medianamente azotémicos, tenían una TFG baja mientras que otros padecían fenómenos de hiperfiltración. Estos autores consideraron que la presencia de TFGs normales en estos pacientes podía ser debido a que la lesión renal no fuera tan severa como para alterar la funcionalidad o a que presentaran un estadio más avanzado de fallo renal.

En trabajos en los que se ha valorado la lesión renal en pacientes humanos con leishmaniosis visceral se describió que el 44% de los pacientes tenían TFG normales, el 28% reducidas y 28% elevadas; siendo estos últimos los que presentaban hipoalbuminemias más graves y fiebre diaria (Lima verde y cols., 2007). En este trabajo se concluyó que la anemia, hiponatremia, hipoalbuminemia y la hipotensión pueden ser la causa del descenso del flujo sanguíneo renal y por lo tanto de la reducción de la TFG. Nuestros resultados no coinciden con los descritos por este autor ya que los pacientes con filtraciones más bajas no se correspondieron con los que tenían hematocrito, ni albúmina más bajos, presentaban presiones arteriales dentro el rango de la normalidad y ninguno tenía fiebre.

En medicina veterinaria son muy poco los trabajos que han estudiado la incidencia de hiperfiltración renal. Cortadellas y cols (2008) describieron que de un total de 18 pacientes con Lcan no azotémicos, 4 del grupo proteinuria *borderline* y 5 del grupo proteinuria, presentaron hiperfiltración (TFG > 4,5 ml/kg/min).

En medicina humana se define la hiperfiltración como una TFG por encima de 2 desviaciones estándar, sobre la media de los individuos sanos (*National Kidney Foundation.*, 2002). Otros autores definen la hiperfiltración como un aumento de la fracción de filtración, de manera que esta última aumenta si el flujo plasmático renal efectivo desciende más que la TFG (Huang y cols., 2011).

La TFG puede aumentar de manera fisiológica en respuesta a una dieta rica en proteínas o durante la gestación; pero también puede aparecer como una manifestación temprana de enfermedad renal. El aumento de filtración por nefrona remanente ocurre como un mecanismo adaptativo a la pérdida de nefronas, y da lugar a hipertensión e hipertrofia glomerular, glomeruloesclerosis y a un declive progresivo de la función renal (Helal y cols., 2012).

En modelos animales experimentales en los que se provocó una reducción de la masa renal, las nefronas remanentes se hipertrofiaron y esto se asoció a una reducción de la resistencia arteriolar y aumento del flujo sanguíneo. El descenso de la resistencia a nivel de la arteriola aferente fue mayor que la eferente, provocando hipertensión glomerular, contribuyendo a la progresión de la enfermedad renal (Hostetter y cols., 1981).

Nuestros resultados demuestran que, en general, la TFG no varió como consecuencia del tratamiento ni a lo largo del tiempo, en ninguno de los dos grupos de estudio.

Estudios de funcionalidad renal realizados en pacientes humanos antes y después de la administración de antimoniales han demostrado una reducción de la prevalencia de microalbuminuria después del tratamiento (35% vs 8%), sugiriendo que la lesión glomerular está provocada por la presencia del parásito pero que no afecta a la TFG, ya que no se encuentran diferencias significativas pre y postratamiento en este parámetro (Oliveira y cols., 2012).

Al finalizar el tratamiento uno de los pacientes incluidos en el grupo G (G6) y que sufrió un fallo renal agudo debido a estibointoxicación durante el tratamiento, presentó valores de filtración por encima del rango normal en D90 pero sin azotemia.

Algunos autores han demostrado que la administración de dosis altas de antimoniales durante 30 días (40 mg/kg/día) puede reducir la TFG y producir disfunción tubular manifestada como una incapacidad para concentrar la orina y un aumento en la excreción de Na^+ (Sampaio y cols., 2003). Otros estudios experimentales en ratas, sin embargo, afirman que dosis altas de antimoniales no reducen la TFG pero sí alteran la capacidad de concentración (Veiga y cols., 1990).

El estudio de Wehner y cols (2008b) muestra una correlación significativa débil entre la reducción de la excreción renal y el aumento de la proteinuria, y esto puede ser debido a que algunas enfermedades como la leishmaniosis pueden dar lugar a una pérdida de proteínas a pesar de una función excretora normal. Por otro lado afirma que hay una correlación significativa entre el aumento de la presión arterial sistólica y la reducción de la función excretora.

En relación a los pacientes en los que encontramos reducción de la TFG (G12, M3 y M4). G12 se clasificó en estadio IRIS II al principio y al final del tratamiento (creatinina D0 1,66 mg/dl, creatinina D90 1,82 mg/dl) y presentó una TFG reducida en ambos tiempos (TFG 1,5 ml/kg/min).

El paciente M3 que inicialmente se clasificó como IRIS I (Cr D0 1,3 mg/dl) posteriormente pasó a IRIS II (Cr D90 1,9 mg/dl), pero mantuvo TFG bajas en ambos tiempos (1,8 vs 1,6) y redujo el UPC (2,9 vs 0,4). En este caso la reducción de la proteinuria en el contexto de una baja TFG y un aumento de creatinina se debe interpretar como un empeoramiento de la lesión renal y una reducción en el número de nefronas viables capaces de eliminar proteína. Lo mismo ocurrió en el caso del paciente M5, salvo que en éste la TFG se redujo pero se mantuvo en valores normales (3,9 vs 2,7).

El caso del paciente M4 se produjo un incremento de la creatinina pero se mantuvo en estadio II de IRIS (1,5 vs 1,87), redujo ligeramente la TFG (1,5 vs 1,4) y aumentó el UPC (1,65 vs 2,73). En este caso la proteinuria se podría interpretar quizá como resultado de un intento de aumento de filtración e hipertensión renal.

Cortadellas y cols (2008) encontraron una correlación positiva pero baja entre la TFG y la PS, UPC y la densidad urinaria. Nosotros no hemos encontrado correlación entre la presión sistólica y la TFG, ni entre la TFG y el UPC.

En la primera visita se encontraron correlaciones significativas negativas entre la TFG con la creatinina y la urea; lo cual es lógico ya que el descenso de la funcionalidad renal produce un acúmulo de toxinas urémicas, entre ellas la urea y la creatinina. La misma correlación con la creatinina se encontró en la última visita en el grupo M.

Por lo tanto aunque la TFG no se modificó de manera significativa en ninguno de los dos grupos, las TFGs inicialmente más bajas no se recuperaron después del tratamiento, sugiriendo la existencia de lesiones renales irreversibles producidas por el parásito que afectaron a la funcionalidad.

Creatinina

En relación a la creatinina no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en los días en los que fue monitorizado este parámetro, pero si en el incremento del valor en los rangos de tiempo. En concreto, en el Grupo G el incremento fue más significativo después de terminar el tratamiento (rango de tiempo 0-30), mientras que en el Grupo M este incremento ocurrió en el rango de tiempo 30-90.

En este trabajo, se ha determinado el incremento del parámetro respecto al valor basal. Mateo y cols (2009) sin embargo, determinaron el porcentaje de pacientes en los que se produjo el cambio y concluyeron que al final del tratamiento (Día 42 en este estudio) este incremento fue más significativo en el Grupo G en el Grupo M

Ikeda-García y cols (2007) describieron que uno de los ocho pacientes que antes de recibir tratamiento con antimoniales ya presentaba alteración en el urianálisis y en los niveles de urea, murió a los tres días de tratamiento debido al agravamiento del síndrome urémico. En relación a estos hallazgos, en nuestro trabajo encontramos que dos pacientes del Grupo G cambiaron de estadio en la clasificación IRIS en D30. En concreto el paciente G11 pasó de estadio I a II (en el rango de tiempo 0-90) y el G12 del II al III (en el rango de tiempo 0-30), lo cual pone de manifiesto la nefrotoxicidad potencial de este fármaco.

Sin embargo en el grupo M también observamos que en el rango 30-90 los pacientes M3 y M5 pasaron del estadio I al II, y el M8 de estadio II a III. En el caso del paciente M8 posiblemente parte se deba a la una azotemia prerrenal , puesto que sufrió un cuadro de diarrea hemorrágica un mes antes al control del día 90 y además debido al aumento de creatinina no se pudo realizar el aclaramiento creatinina exógena en ese momento. En el caso del paciente M3 el empeoramiento de la enfermedad renal lo atribuimos a la propia evolución de la misma asociada a la escasa respuesta al tratamiendo Leishmanicida.

Proteinuria

En relación con la proteinuria, hemos encontrado que aunque los dos fármacos redujeron la proteinuria, esta reducción solo fue estadísticamente significativa en el Grupo G en el rango de tiempo 0-90 ($p = 0.0186$). Sin embargo posiblemente esta reducción se produzca durante el periodo de administración del fármaco (rango 0-30 $p = 0.0537$). Sin duda esta reducción de la proteinuria, más evidente en el Grupo G, indica una mayor eficacia de este fármaco en el tratamiento de la enfermedad causante del problema renal. De hecho, la correlación positiva del UPC con las globulinas totales al final de nuestro estudio en el Grupo G confirma la

importancia que tiene la producción de anticuerpos y su depósito en el glomérulo en la patogenia de la lesión renal producida por Lcan (Zatelly y cols., 2003).

Aún a pesar de esta reducción y de recibir al mismo tiempo tratamiento de soporte renal, la gran mayoría de los pacientes que inicialmente eran proteinúricos permanecieron así al final del estudio; esto es en el grupo G, 5/11 proteinúricos en D0 vs 3/11 en D90 y en el grupo M, 5/7 en D0 vs 4/7 en D90. En el estudio de Pierantozzi y cols (2013) 24/53 (45,2%) pacientes proteinúricos tratados con antimoniales se mantuvieron proteinúricos al final del tratamiento.

En el Grupo G un paciente pasó de ser P a BP mientras que en el estudio de Pierantozzi esto ocurrió en el 22.6% de los pacientes. En el Grupo M un paciente pasó de P a BP.

En el Grupo G solo un paciente pasó de ser P a NP al contrario de lo que ocurrió en el estudio de Pierantozzi en el que el 13,2 % de los pacientes pasaron de P a NP.

Algunos pacientes siguieron presentando proteinuria a pesar de la normalización de la presión arterial tras la administración de fármacos antihipertensores. La falta de respuesta completa puede ser debida a un bloqueo incompleto del eje RAA y coincide con algunos estudios en los que la reducción de la presión arterial no es proporcional a la reducción de la proteinuria tras la administración de un IECA (Grauer y cols., 2000). Esto concuerda con los datos que nosotros hemos obtenido ya que hemos observado que algunos pacientes que recibieron dosis altas de IECA mantenían UPC altos. Si bien es cierto que este último hecho fue más frecuente en el grupo M.

Wehner y cols (2008b) encontraron una correlación débil y positiva entre el UPC y la presión sistólica, lo cual indica que la hipertensión sistémica no siempre está asociada a proteinuria. Nosotros hemos encontrado una correlación positiva entre el UPC y la PAS en el Grupo M en la visita del día 30, pero no en el resto del estudio.

Al igual que en el trabajo de Pierantozzi y cols (2013) en la primera visita se encontró una correlación significativa negativa entre el UPC y la albúmina plasmática como ya había descrito previamente Palacio y cols (1995), que en nuestro estudio se mantuvo después del tratamiento en el Grupo G. En un paciente con Lcan la hipoalbuminemia se puede deber a la pérdida renal, la falta de síntesis asociada al proceso inflamatorio y al descenso de ingesta de proteína (Ikeda García y cols., 2007).

A diferencia del estudio de Plevraki y cols (2006) en el que se demostró una reducción de la proteinuria a los 6 meses de la administración de alopurinol, en nuestro estudio, al igual que en el de Pierantozzi y cols (2013), la reducción de la proteinuria es anterior comenzando justo al

terminar el tratamiento. Este hecho se puede deber a la diferencia en el tipo de fármaco administrado, ya que el alopurinol no tiene efecto leishmanicida sino leishmanioestático.

A diferencia del estudio de Pierantozzi y cols (2013), pensamos que los pacientes con Lcan necesitan tratamiento nefroprotector ya que aunque la proteinuria se reduce después del tratamiento, no hay una resolución completa de la misma de manera que muchos de los pacientes que antes del tratamiento eran proteinúricos, se mantiene proteinúricos al final, aunque en menor medida. Un fármaco tipo IECA por tanto resulta recomendable para reducir en el mayor grado posible la proteinuria y así retrasar la progresión de la enfermedad renal.

Densidad de la orina (DU)

En nuestro trabajo hemos identificado en la primera visita 2/20 pacientes (10%) que presentaban densidades de orina por debajo del límite inferior al rango de referencia (1.015-1.050). Sin embargo se considera que la media de la densidad a lo largo del día debería ser >1.020 e incluso la primera orina de la mañana >1.030-1.040 (Chew y cols., 2011).

En nuestros pacientes fue muy complicado obtener la primera orina de la mañana, ya que aunque los animales fueron citados por la mañana muchos de ellos ya habían orinado e incluso bebido. Por otro lado la medición de la densidad se realizó de manera puntual y no como una media de varias muestras. Si tomamos el valor de referencia como >1.030, ya que la muestra se tomó por la mañana aunque no fuera la primera, 12 pacientes (60%) no concentraban de forma adecuada la orina. Estos resultados están más en la línea de los trabajos llevados a cabo en pacientes humanos con leishmaniosis visceral.

En estos trabajos realizados en medicina humana se ha comprobado la existencia de una lesión tubular antes del tratamiento mediante la combinación de varias pruebas diagnósticas específicas de lesión tubular como el ratio osmolalidad urinaria/plasmática (U/P osm) post desmopresina, la capacidad de acidificación de la orina después de administrar CaCl_2 , la excreción fraccionada de iones y el flujo transtubular de potasio (Lima verde y cols., 2007; Oliveira y cols., 2011).

Salgado Filho y cols (2003) también demostraron la disfunción tubular proximal, en base a los niveles de proteína transportadora de retinol, en casi la mitad de los pacientes de su estudio.

Además de comprobar la lesión tubular antes del tratamiento otros trabajos han intentado averiguar si esta lesión es reversible. Daher y cols (2011) confirmaron la rápida recuperación de la función glomerular y tubular a excepción de la persistencia de una acidosis tubular renal. Otros estudios de funcionalidad renal realizados en pacientes humanos antes y después de la

administración de antimoniales reportaron que debido a que la mejoría en la capacidad de acidificación y concentración postratamiento no llegó a ser estadísticamente significativas, no se podía descartar que la lesión tubular pretratamiento fuera una lesión permanente y producida por el parásito o que el tratamiento tuviera un efecto añadido (Oliveira y cols., 2012).

En nuestro estudio hemos demostrado que no existieron diferencias significativas en la densidad de la orina entre los grupos de tratamiento ni tampoco a lo largo del tiempo. Incluso en la gráfica de interacción se observó que ni el fármaco ni el tiempo afectaron a la densidad de la orina. Es decir, que si pensamos que partíamos de orinas poco concentradas, estos pacientes no recuperaron la capacidad de concentración postratamiento; lo cual sugiere que la lesión tubular que induzca el déficit de concentración, no se recupera.

Electroforesis de proteínas en orina

La leishmaniosis causa una ERC en los perros, caracterizada por el desarrollo de una glomerulonefritis debido al depósito de inmunocomplejos (Ciaramella y cols., 1997) nefritis intersticial y ocasionalmente amiloidosis (Poli y cols., 1991; Koutinas y cols., 1999). Los IC producen una reacción inflamatoria secundaria (Grauer., 2000) con reducción de la perfusión en los capilares peritubulares dando lugar a isquemia tubular e intersticial (Scott., 1983). La ERC se puede iniciar por una lesión glomerular, tubular o de ambas. Independientemente de la causa, la función renal se correlaciona mejor con los cambios tubulointersticiales como la fibrosis intersticial, la degeneración y atrofia tubular, pérdida de capilares peritubulares y finalmente destrucción de la funcionalidad de la nefrona (Eddy., 2005). La detección precoz de la lesión y de la alteración de la función tubulointersticial, permite una intervención más temprana con terapias renoprotectoras que ralenticen la progresión de la enfermedad, y por lo tanto mejoren la esperanza de vida (Navity., 2010a).

La electroforesis de proteínas en orina permite clasificar las proteínas en función de su peso molecular y así identificar su posible origen glomerular o tubular. El siguiente paso, si quisiéramos identificar exactamente el tipo de proteínas, sería realizar otro tipo de técnicas como por ejemplo el Western blot y Maldi tof, que serán objeto de estudio por nuestro grupo en un futuro próximo.

Con el objetivo de aumentar la especificidad del patrón electroforético respecto a la lesión renal y aumentar la fiabilidad de los resultados, en este trabajo la orina fue normalizadas en relación a la cantidad de proteína (Naviy., 2010a) inyectando en cada pocillo del gel 10 µg/ µl.

Para el análisis de los patrones electroforéticos de la orina, en la mayoría de los trabajos se compara el número total de bandas proteicas presentes en animales enfermos con las halladas en animales sanos. Esta misma comparación se realiza para los patrones de alto y bajo peso molecular. Sin embargo, en nuestra opinión, esta forma de clasificación puede llevar a error ya que a la hora de separar las bandas, en la lectura obtenida mediante densitometría, se puede incurrir en un exceso de separación de manera que obtengamos un número de bandas falsamente aumentado. Por otro lado, en algunas ocasiones no resultó fácil identificar todas las bandas, especialmente las que tenían una baja densidad óptica y se podían confundir con la densidad óptica del fondo de la línea. Por ello, finalmente decidimos realizar el análisis estadístico de las electroforesis en base a la suma de la densidad óptica de las bandas de proteínas localizadas por encima y por debajo del peso molecular de la albúmina según la técnica descrita por (Naviy., 2010b).

En el trabajo llevado a cabo por Cavalcante y cols (2013) se describió un método cuantitativo para calcular la cantidad exacta de PAPM y PBPM. Mediante electroforesis SDS-PAGE se determinó la densidad óptica de cada región (PAPM y PBPM) en relación a la densidad óptica total de todo el trazado electroforético, refiriendo el cálculo final referido a la cantidad total de proteína introducida en cada pocillo (5µg). El valor se calculó considerando la concentración de proteínas presentes en la muestra de orina (mg/ml) y utilizando la cantidad de creatinina en la orina (mg/ml) para corregir posibles errores por dilución. De esta manera, estos autores pudieron calcular el UPC de cada región. Con este método demostraron que los perros con hiperadrenocorticismos tenían mayor cantidad de PBPM en la orina, comparado con el grupo de perros control, o lo que es lo mismo, se confirmó una lesión tubular. Sin embargo nosotros consideramos que esta técnica, a diferencia de lo que opinan sus autores, es un método semicuantitativo que permite estimar la mayor o menor cantidad de bandas o densidad de proteínas a un lado u otro del punto de corte, pero no permite la cuantificación exacta de PAPM ó PBPM.

A lo largo de todo el seguimiento se encontró una correlación negativa y significativa ($r=-1$; $p=0.0000$) entre el porcentaje D.O. de PAPM y de PBPM, ya que al estar expresada la densidad óptica sobre un porcentaje, si una fracción sube la otra tiene que reducirse. Finalmente decidimos realizar la interpretación en base al porcentaje que cambió la PBPM, ya que para nosotros sería el marcador que definiera la posible lesión tubular inducida por el efecto del fármaco y como se comentará posteriormente, porque los cambios encontrados en la porcentaje D.O. PAPM en principio no se explican con los resultados del resto de los parámetros laboratoriales encontrados en estos pacientes.

En nuestro estudio encontramos dos patrones electroforéticos claramente diferentes en función del UPC, atendiendo al número de bandas y a la densidad óptica. En general se obtuvieron siempre un patrón mixto tubular y glomerular en todos los tiempos estudiados.

Entre los marcadores de peso molecular 50 y 75 kDa se encontró una banda constante en todos los pacientes, que muy probablemente se correspondía con la albúmina. Yalcin y cols (2004) observaron que la banda de 66 kD fue la más frecuentemente encontrada tanto en el grupo de animales sanos como en los que padecían enfermedad renal. Su presencia no se consideró patológica porque la orina de perros sanos puede contener entre 40-60% de albumina (Porter., 1964; Harvey y Hou., 1966).

Aunque algunos pacientes proteinúricos presentaron una banda en el marcador de peso molecular de 100 kDa, esta banda apareció también en los pacientes no proteinúricos y tuvo en estos últimos mayor densidad óptica. Yalcin y cols (2004) encontraron con frecuencia en la orina de perros sanos y enfermos renales una banda correspondiente a 98 kDa que se podría corresponder con proteínas de Tamm-Horsfall que se encuentra en la orina de perros sanos. Zaragoza y cols., 2003a; 2003b; 2004 también encontraron una banda de 100-110 kDa en la población control. Las proteínas producidas normalmente por los túbulos pueden desaparecer en ERC (Prajce y cols., 2010; Raila y cols., 2003) lo que explicaría que en nuestros pacientes proteinúricos esta banda a veces no se observe, siendo más frecuente en los no proteinúricos. Schultze y Jensen (1989) describieron que las bandas correspondientes a 100 kDa podían corresponderse con la transferrina y debido a que esta disminuye en el plasma durante los procesos inflamatorios, podría disminuir su excreción urinaria (Gallardo y cols., 2008). Por lo tanto, a falta de pruebas más específicas que pudieran identificar a qué tipo exacto de proteína corresponde la banda encontrada con un peso molecular 100 kDa, pensamos que sería compatible o bien con proteína de Tamm-Horsfall o con transferrina. Estudios posteriores permitirán identificar exactamente el origen de esta banda.

Zaragoza y cols (2003a) observaron que el patrón electroforético en perros con Lcan fue muy homogéneo y diferente al de los pacientes sanos. De hecho en la orina de los pacientes con Lcan encontraron una serie de bandas localizadas en 40-60 kDa, 80-90 kDa y 100-150 kDa, que estaban ausentes en la orina de perros sanos. Nosotros al no disponer de población control, no podemos confirmar estos hallazgos, aunque será objeto de futuros estudios.

En las orinas no proteinúricas ($UPC < 0.5$) se observó una media de 11 bandas (min 3 bandas, máximo 15 bandas), mientras que en las proteinúricas hubo una media de 16 bandas (min 13 bandas, máximo de 22). Es decir los pacientes proteinúricos presentan un mayor número de bandas.

También Zaragoza y cols (2003a) hallaron 11 bandas en pacientes con Lcan, igual que en nuestros pacientes no proteinúricos, y 5 en pacientes sanos. Estos datos contrastan con los obtenidos por Buono y cols (2012) que encontraron un mayor número de bandas en pacientes con Lcan (35-45 bandas) que en pacientes sanos (25-30 bandas), es decir más que en nuestro estudio.

Observamos una correlación positiva moderada y significativa ($r = 0,6355$; $p = 0,0046$) entre el número de bandas y el UPC, muy parecida a la descrita por Buono y cols (2012) ($r = 0,66$). En este último trabajo también se describe una correlación del número de bandas y el ratio albúmina/creatinina ($r = 0,64$), dato que nosotros no podemos contrastar al no haber analizado este último parámetro.

En medicina humana también se ha observado un patrón electroforético de proteína en orina diferente en pacientes con leishmaniosis. En el trabajo realizado por Kumar y cols (2011) se demuestra mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot en orina de pacientes con leishmaniosis visceral tratados con miltefosina, que la excreción diferente de proteínas urinarias puede ser correlacionada con la severidad de la enfermedad y además confirma la presencia temporal de antígeno urinario. Antes del tratamiento encontraron 8 bandas de proteínas (17, 25, 28, 43, 47, 54, 60 y 85 kDa). En el Western blot se confirmó la antigenicidad de cuatro proteínas pretratamiento (25, 28, 54 y 60 kDa), desapareciendo dos en el postratamiento (las correspondientes a los pesos moleculares de 25 y 28 kDa). Sin embargo en otros trabajos no se encontró ninguna proteína marcadora que pudiera diferenciar a los pacientes con leishmaniosis visceral de los pacientes control (Singh y Sundar 2012). Por otro lado Zaragoza y cols (2003a) demostraron también mediante Western blot que el 68% de los pacientes enfermos con Lcan eliminaban por orina IgG y el 55% eliminaban IgA, ambas de cadena ligera (20-30 kDa) y pesada (43-45 kDa); mientras que en los pacientes sanos no existía este tipo de patrón. Posteriormente Bonfanti y cols (2004) concluyeron que la proteinuria de cadena ligera (22-27 kDa) puede estar presente en los pacientes expuestos o infectados por un agente infeccioso, y que la excreción de estas proteínas no refleja ni una lesión morfológica ni funcional renal.

En este estudio hemos observado diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de densidad óptica de las proteínas de alto y bajo peso molecular (D.O. PAPM y PBPM) al terminar el tratamiento. Estas diferencias son más notables en el incremento promedio del porcentaje de D.O. en el rango de tiempo 30-90.

En el Grupo G se observó al final del tratamiento (D30) un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de D.O. PAPM y una reducción del porcentaje de D.O. PBPM. A diferencia del trabajo de Kumar y cols (2011) podemos descartar que estas PBPM se

correspondan con antígeno parasitario puesto que la PCR anidada en orina descartó la presencia de ADN del parásito antes del tratamiento. Por lo tanto, esta reducción de PBPM pudiera ser debida al efecto de reducción de la inflamación, confirmado mediante la normalización de las proteínas inflamatorias, y por tanto posiblemente de la nefritis tubulo intersticial, o quizás también por la reducción en la eliminación de inmunoglobulinas. No podemos explicar el incremento de PAPM en nuestros pacientes ya que precisamente en este grupo se produjo una reducción significativa del UPC y además se elevó la albúmina plasmática, por lo tanto pensamos que el cambio primario depende de la PBPM y la PAPM se modifica para mantener el porcentaje. También, como se comentará más adelante, el aumento del porcentaje de PAPM pudiera deberse a la eliminación de otras PAPM como la FS.

En D90 el UPC se correlacionó negativamente con porcentaje de D.O. PAPM y positivamente con porcentaje de D.O. PBPM. Esta correlación pueden ser debida a que en el Grupo G se estén eliminando proteínas de bajo peso molecular por la orina, aunque haya habido una reducción de las mismas en el rango de tiempo 0-30. De hecho en el Grupo G en la visita D90 se encontró una correlación positiva del UPC con las Glob T, lo cual podría significar que dos meses después del tratamiento estos pacientes siguen eliminando inmunoglobulinas por la orina.

Por otro lado, desde el final del tratamiento y hasta la última revisión (D30-D90) se observó una reducción estadísticamente significativa del porcentaje de D.O. PAPM y un incremento del porcentaje de D.O. PBPM. Bianciardi y cols (2009) demostraron en animales sanos que la lesión tubular inducida por los antimoniales era evidente cuatro semanas después de terminar el tratamiento (día 55) sin signos de regeneración, lo que coincide con el intervalo entre el D30 y D90 de nuestro estudio. La lesión tubular inducida por este fármaco podría confirmar el aumento de las PBPM al terminar el periodo de seguimiento (8 semanas después de finalizado el tratamiento), que posiblemente se podría haber detectado antes si la electroforesis se hubiera adelantado 4 semanas. Para confirmar esta hipótesis hubiera sido interesante determinar alguna proteína que indicara lesión tubular como por ejemplo la proteína transportadora de retinol.

En el Grupo M no se observaron cambios estadísticamente significativos desde el inicio al final del tratamiento y desde éste último hasta la última revisión. Sin embargo, a lo largo de todo el seguimiento (D0-D90), el resultado final fue un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de D.O. PAPM y una reducción del porcentaje de D.O. PBPM. Estos cambios quizás se puedan atribuir a cierto efecto antiinflamatorio del fármaco ya que, como se verá posteriormente, se observó una reducción de las proteínas de fase aguda; aunque el cambio fue no significativo; o quizá a la reducción en la eliminación de inmunoglobulinas. Por otro lado la reducción de las PBPM confirma los resultados obtenidos por Bianciardi y cols (2009) en relación a la ausencia de lesión tubular encontrada en los pacientes tratados con miltefosina.

En la visita del día 90 en el Grupo M se encontró una correlación positiva entre la creatinina y el porcentaje de D.O. PAPM y negativa con el porcentaje de D.O. PBPM. Esto concuerda con los datos encontrados en el UPC (en este grupo no hubo una reducción significativa del mismo) y de la albúmina sérica (no hubo un aumento significativo de la misma). Es decir, es posible que en estos pacientes el empeoramiento de la azotemia sea debido a que siguen perdiendo albúmina por orina debido a que no se ha resuelto la lesión renal asociada a la presencia del parásito, contribuyendo por lo tanto a la evolución de la enfermedad renal. Para confirmar que efectivamente se trata de albúmina deberíamos determinar la cantidad exacta de la misma en la orina.

Xantinuria

La administración prolongada de alopurinol puede dar lugar a la formación de cálculos urinarios de xantina.

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas entre el número de pacientes que desarrolló cristaluria por xantina en ninguno de los grupos (aunque los perros G8 y M12, al finalizar el tratamiento tuvieron xantinuria). Esto fue debido a que los pacientes de ambos grupos recibían alopurinol que es el fármaco responsable de la alteración del metabolismo de las purinas y por lo tanto de la formación de cristales de xantina.

Una de las complicaciones más graves asociadas a la administración de alopurinol es el desarrollo de nefrolitos de xantina, hecho comprobado en pacientes crónicos cuando se administra este fármaco durante periodos prolongados de tiempo (Torres y cols., 2011) En nuestros pacientes se comprobó además mediante ecografía abdominal, que ninguno presentaba cálculos urinarios.

En la literatura encontramos casos como los descritos por Torres y cols (2011). Ellos describiendo que 3/23 pacientes desarrollaron cálculos y uno de ellos hidronefrosis.

En otros trabajos, sin embargo, describen que de los 19 perros tratados diariamente con alopurinol durante 6 años, ninguno desarrolló urolitiasis (Manna y cols., 2015).

En cualquier caso, se recomienda realizar análisis de orina periódicos con el fin de detectar la presencia de cristales y en tal caso retirar temporalmente el fármaco; o reconsiderar la dosis terapéutica que no cause efectos adversos, así como mantener una correcta hidratación (Miró y cols., 2013).

Proteínas de fase aguda (PFA)

A la hora de interpretar los datos relativos a las proteínas de fase aguda (PFA) hubiera sido útil contar con un grupo control para monitorizar la evolución de las mismas en pacientes no tratados, lo cual es inviable en pacientes con infección natural por motivos éticos. Sin embargo, como se comentará en la descripción de la evolución de cada proteína, estos resultados ya están disponibles en estudios publicados en pacientes con infección experimental y son en los que hemos basado la discusión de nuestro estudio.

Por otro lado, en medicina humana, se ha descrito que la persistencia de concentraciones elevadas de esas proteínas después del tratamiento se asocia a una posible resistencia al fármaco administrado. En lo que se refiere a las proteínas inflamatorias no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de tratamiento en las tres visitas. Sin embargo, en los rangos de tiempo 0-30 y 0-90 se observaron diferencias significativas para FS y PON-1. En ambos grupos ambas proteínas se modificaron en la misma dirección (reducción de la FS y aumento del PON-1) pero el cambio fue menor en el Grupo M y sin significación.

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento este es el primer trabajo en el que se compara el efecto de estos dos principios activos, miltefosina y antimonio de metilglucamina, sobre las PFA y el primero en el que se valora el efecto de la miltefosina. Los trabajos publicados han valorado el efecto en pacientes que recibieron sólo alopurinol (Martínez-Subiela y cols., 2011; 2014) o con antimonio de metilglucamina (Martínez-Subiela y cols., 2003; Rossi y cols., 2014).

Proteína C reactiva (Prot. CR)

En el Grupo G se observó una reducción estadísticamente significativa de la Prot. CR en los rangos de tiempo 0-30 y 0-90. En el Grupo M la reducción fue menor y no significativa.

En general, en todos los pacientes se observó una tendencia a la reducción de la Prot. CR salvo en el caso M8 que fue el paciente que sufrió una hemorragia digestiva necesitando hospitalización y transfusión sanguínea.

En perros con infección experimental encontraron un valor medio de Prot. CR preinfección de 5,93 mg/L, con un valor máximo a los 3 meses (37,56 mg/L) que luego se redujo progresivamente a 12,8 mg/L a los 7 meses (Martínez-Subiela y cols., 2011).

Estos mismos autores en 2003, en pacientes con infección natural tratados con antimoniales, describieron un valor Prot. CR antes del tratamiento de 27,23 mg/L, descendió del día 0 al 35 de tratamiento, seguido de un ligero aumento el día 50 para alcanzar una concentración media de 7,6 mg/L. Sin embargo en el grupo que sólo recibió alopurinol se produjo un descenso progresivo más lento (del día 0 al día 60) para alcanzar una concentración media de 4,27 mg/L (Martínez-Subiela., 2003). La media de nuestra población en D0 fue de 30,10 mg/L y, al igual que el trabajo mencionado anteriormente, tanto en el Grupo G como en el Grupo M se produjo una reducción al finalizar el tratamiento (día 30) para luego aumentar ligeramente hasta el día 90, pero a diferencia del Grupo M, en el Grupo G se alcanzaron valores normales antes, lo cual sugiere una mayor eficacia/rapidez de acción de este fármaco.

Al igual que el trabajo realizado por Méndez y cols (2014) en pacientes con filariosis, el aumento inicial de Prot. CR fue medio, aproximadamente 3 veces el valor normal. Este hallazgo puede reflejar probablemente que el estado inflamatorio asociado a la enfermedad no es grave, ya que se han descrito incrementos mayores asociados a una mayor lesión tisular y reacción inflamatoria en otras enfermedades infecciosas como la ehrlichiosis (Milonakis y cols, 2011) o la babesiosis (Matijatko y cols., 2007). Por lo tanto los incrementos más severos en algunos pacientes aislados pueden indicar la presencia de otros procesos inflamatorios o infecciosos (Méndez y cols., 2014).

En el estudio llevado a cabo por Martínez-Subiela y cols (2011) valoraron la cinética de varias PFA (Prot. CR, Hp y amiloide sérico) en Beagles infectados experimentalmente por *Leishmania* en respuesta al tratamiento con alopurinol. Sus resultados ponen de manifiesto que la Prot. CR y amiloide sérico se reducían significativamente un mes después de iniciar el tratamiento, es decir antes que en el trabajo anteriormente publicado por los mismos autores. Por tanto, se puede concluir que, a diferencia de los perros infectados experimentalmente, los pacientes con infección natural muestran un descenso más lento en todas las proteínas de fase aguda (Martínez-Subiela., 2003).

Sin embargo, cuando las PFA ya habían alcanzado valores normales todavía existían alteraciones en las IgG y en las IgM respecto al inicio del tratamiento. Esto demuestra que el patrón electroforético tiene bajo potencial como biomarcador para monitorizar la respuesta al tratamiento comparado con las PFA (Martínez-Subiela., 2003; 2011).

Raila y cols (2011) demostraron en pacientes con ERC una correlación directa entre la Prot. CR y el aclaramiento de creatinina exógena, el UPC y glóbulos blancos. Los pacientes urémicos presentaban valores más elevados de Prot. CR.

En nuestro estudio en la primera visita encontramos una correlación significativa negativa entre la Prot. CR y la albúmina y el cociente A/G, y positiva con el UPC. La primera correlación demuestra la tendencia opuesta durante la inflamación entre la Prot. CR (proteína de inflamación positiva) y la albúmina (proteína de inflamación negativa) y por lo tanto, si aumenta la inflamación se reducirá el cociente A/G. En el caso de la albúmina la proteinuria también tiene un papel importante en la reducción de sus niveles plasmáticos (Ceron y cols., 2013). Por otro lado las lesiones inflamatorias renales, como las nefritis intersticiales descritas en pacientes con Lcan, pueden producir exudación de proteínas hacia el espacio urinario procedentes de los capilares peritubulares (Lees y cols., 2005). Incluso, y en relación con el proceso inflamatorio, podrían tener un origen prerrenal y corresponderse con inmunoglobulinas de cadena ligera (Bonfanti., 2004) como parte de la respuesta inmunológica adaptativa o respuesta humoral específica.

Las correlaciones negativas encontradas en nuestro estudio entre la Prot.CR y la paraoxonasa-1, confirman a la primera como una proteína inflamatoria positiva y a la segunda como una proteína de fase aguda negativa.

Haptoglobina (Hp)

En el Grupo G se observó, en todos los rangos de tiempo, una reducción no significativa de la Hp. Sin embargo en el Grupo M esta reducción fue significativa en el rango 0-90. Estos hallazgos son similares a los obtenidos por Martínez-Subiela y cols (2003) en los que se observó una ausencia de reducción en la Hp en el grupo de pacientes que recibían antimoniales que por el contrario no ocurría en el grupo que recibió alopurinol, atribuyendo este hecho a que en los primeros se produce una estimulación hepática para la síntesis de esta PFA. Esta estimulación también se ha observado en pacientes que recibieron tratamientos con corticosteroides y/o antihelmínticos, sugiriendo que esta PFA aumenta en la fase activa de detoxicación del fármaco en el hígado (Harvey y cols., 1987; Tosa y cols., 1993). En base a estos resultados parece que en la monitorización del tratamiento con antimoniales sería mejor utilizar otras PFA como la Prot. CR o la ceruloplasmina (Martínez-Subiela y cols., 2003) que no se modifican por cambios en el metabolismo hepático.

Martínez-Subiela y cols (2011) en perros con infección experimental obtuvieron un valor medio preinfección de Hp de 1,69 g/L, detectándose el valor más alto a los dos meses post infección (4,25 g/L), y manteniéndose elevada durante todo el periodo de infección. En nuestra población de estudio en el D0 la media fue de 3,88 g/L, con un mínimo de 0,92 g/L y un máximo de 5,42 g/L.

Los mismos autores demostraron una reducción significativa de Hp durante el primer, segundo y cuarto mes después del inicio del tratamiento (Martínez-Subiela y cols., 2011), mientras que en la infección natural la reducción no fue significativa hasta pasados dos meses del inicio del tratamiento con alopurinol (Martínez-Subiela y cols., 2003). En nuestro trabajo en ninguno de los dos grupos se llegaron a alcanzar valores dentro del límite de referencia.

La presencia de valores muy altos de Prot. CR que no van acompañados de un incremento importante de la Hp (>4g/L) nos deberían hacer sospechar de hemólisis o hemorragia (Cerón y cols., 2008). En estos dos casos la reducción de los niveles de Hp es fruto de su unión a la hemoglobina libre, evitando de esta manera la eliminación renal de hierro y protegiendo a los vasos sanguíneos de los efectos oxidativos de esta proteína (Giblett, 1968). Posteriormente se cree que estos complejos Hp-hemoglobina se dirigen hacia el hígado, al sistema reticuloendotelial y son metabolizados por las células de Kupffer (Cerón., 2005). Entre nuestros pacientes con epístaxis solo hemos encontrado un aumento de la Prot. CR no asociado a un aumento de Hp en el caso G4, el resto de los pacientes tuvieron Hp por encima de 5 g/L.

En la segunda visita del Grupo M encontramos una correlación positiva entre la paraoxonasa-1 y la Hp. También en el intervalo de tiempo 0-30 de este grupo se observó un aumento de ambas proteínas, ambos cambios no significativos.

Ferritina sérica (FS)

En los dos grupos de tratamiento se observó un incremento de la FS en la vista D0 que en el Grupo G se redujo de manera significativa a lo largo del tiempo; mientras que, en el Grupo M la reducción observada no fue estadísticamente significativa.

En un estudio con perros infectados experimentalmente por *Leishmania infantum*, en el que se valoró la evolución de la FS y la Paraxonasa-1 (PON-1), tomando como referencia de inflamación la Prot. CR; se registró el incremento de la FS a partir de los dos meses siguientes a la infección, alcanzando la elevación máxima en este momento 750,1 µg/L (642-3761 µg/L). Esto supuso un incremento de 7,5 veces respecto al valor basal pre infección. A partir de este momento, aunque el valor se mantuvo significativamente elevado respecto al obtenido antes de la infección, se observó un descenso progresivo hasta una concentración media de 405 µg/L (190-432 µg/L) a los siete meses post infección. Dos meses post inicio del tratamiento con alopurinol los valores de FS fueron 94,30 µg/L (40,1-123 µg/L) (Martínez-Subiela., 2014). Dado que la cinética del incremento de FS es muy parecida a la de otras PFA valoradas en infección experimental por los mismos autores (Martínez-Subiela., 2011), aunque en este caso

con un incremento mucho mayor dos meses post infección, se considera que la FS puede actuar como una PFA moderada en la leishmaniosis canina.

En nuestro caso, en el Grupo G partimos de un valor pre tratamiento de 741,8 µg/L (258,5-907 µg/L). Dos meses después de finalizar el tratamiento con antimoniales y tres meses post inicio del tratamiento con alopurinol el valor de ferritina fue 243,1 µg/L (173,4-347,5 µg/L). En el Grupo M el valor pre tratamiento fue de 568,4 µg/L (94,3-883,5 µg/L); dos meses después de finalizar el tratamiento con miltefosina y tres meses post inicio del tratamiento con alopurinol el valor de ferritina fue 420,3 µg/L (93,9-890,5 µg/L). Es decir en ninguno de los dos grupos se alcanzan valores tan bajos como en los descritos en pacientes con infección experimental, incluso un mes más post tratamiento con alopurinol, aunque en el Grupo G la reducción fue mayor.

En el estudio de Martínez-Subiela (2014) dividieron la población con infección natural en relación a su proteinuria y observaron que los pacientes con proteinuria o proteinuria *border line* tenían valores de FS más altos (comparados con los que no tenían proteinuria). Para justificar este hallazgo los autores sugieren que en pacientes humanos con ERC los fenómenos oxidativos pueden ser la causa del aumento de ferritina (Kalantar-Zadeh y cols., 2006).

En nuestro trabajo no hemos encontrado ninguna correlación entre la FS y el UPC, ni con la TFG al inicio ni durante el tratamiento. Aunque no se ha incluido en el estudio estadístico, ya que comparativamente hubo menos pacientes sin proteinuria (5/20) o con proteinuria en el límite (3/20), en nuestro trabajo encontramos pacientes sin proteinuria que tenían niveles de FS elevados (G2 y G9) al igual que todos los pacientes proteinúricos.

Recientemente se ha postulado la posible utilidad de la Ferritina en la orina de los perros con leishmaniosis como un marcador precoz de lesión renal. La Ferritina es una proteína de alto peso molecular de 900 kDa. García-Martínez y cols (2015) demostraron que en la orina de los pacientes positivos leishmaniósicos, con proteinuria y con o sin azotemia (estadios IRIS III-IV), existía un incremento del ratio ferritina urinaria: creatinina (UFerC) en relación a los no proteinúricos (estadios I-II). Por otro lado el descenso de la FS en los pacientes proteinúricos y azotémicos (estadio IV) en relación a los no proteinúricos (estadio I), proteinúricos en el límite (estadio IRIS II) o proteinuricos sin azotemia (estadio III), podría soportar la hipótesis del paso de ferritina a través de la membrana glomerular. En este trabajo encontraron una correlación positiva entre la cistatina urinaria con el ratio UFerC, cistatina urinaria con el UPC y por último entre UFerC y el UPC. Nosotros estamos de acuerdo con estos autores ya que hemos encontrado una correlación negativa entre la ferritina plasmática y el porcentaje de D.O. PAPM

en la visita del día 30 del grupo G; es decir si la FS baja en plasma aumenta el porcentaje de D.O PAPM.

Las correlaciones negativas entre la FS y PON-1 confirma la tendencia opuesta de ambas proteínas durante la inflamación (Martínez-Subiela., 2014); al igual que la correlación con la albúmina, al ser estas dos últimas, proteínas que reducen sus niveles plasmáticos durante la inflamación aguda.

En la última visita del Grupo M la FS se correlacionó positivamente con la puntuación clínica y con las globulinas totales. Esto confirma que los pacientes con una mayor respuesta humoral presentaron una mayor respuesta inflamatoria y por lo tanto un peor estado clínico.

Paraoxonasa-1 (PON-1)

En el Grupo G se observó, en todos los rangos de tiempo, un aumento estadísticamente significativo de PON-1. El incremento de esta PFA en el Grupo M se produjo de manera no significativa en el intervalo de tiempo 0-30, sin embargo en el intervalo 30-90 no hubo cambio.

En el trabajo de Martínez Subiela y cols (2014) citado anteriormente, registraron un descenso de PON-1 en los pacientes infectados experimentalmente un mes después de la infección (1,5/1,2-1,65 UI/L) suponiendo una reducción de 1,8 veces el valor previo a la infección. Luego se observó un incremento significativo cuatro meses post inicio de tratamiento con alopurinol (2,85/2,55-3,45 UI/L).

En nuestro caso en el Grupo G partimos de un valor medio antes del tratamiento más bajo que en el Grupo M, aunque inicialmente no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. Dos meses después de finalizar el tratamiento con G y M, y tres meses post inicio de tratamiento con alopurinol el valor se normalizó en ambos grupos, alcanzando en algún caso valores por encima del rango de referencia. Este incremento fue significativo para el Grupo G y no para el Grupo M, un mes antes de lo descrito en el trabajo de Martínez-Subiela y cols (2014).

En relación a los pacientes con infección natural Martínez Subiela y cols (2014) encontraron valores de PON-1 más bajos en pacientes proteinúricos (2/0,3-5,8 UI/L) comparado con los no proteinúricos (3,1/1,1-6,3 UI/L). En nuestro trabajo las medias del valor de PON-1 en los pacientes proteinúricos fue de (3,38/ 1,95-4,41) mientras que los no proteinúricos fue de (3,368/ 2,19-4,67); es decir muy parecidas. Quizá un estudio posterior con una muestra más grande podría confirmar los resultados de Martínez-Subiela en relación a la proteinuria.

En definitiva, Martínez-Subiela y cols (2014) observaron que los pacientes con infección experimental mostraban un aumento de la FS y una reducción del PON-1 que retornaban a los valores previos a la infección después del tratamiento. Así el descenso del PON-1 ocurrió al mismo tiempo que el aumento de PFA (en el segundo mes post infección), sugiriendo que la inflamación tiene algo que ver con su reducción. En relación a estos dos hallazgos nosotros solo podemos confirmar la correlación negativa que siguen ambos marcadores, ya que al ser pacientes con infección natural no contamos con valores previos, y por otro lado, al final de nuestro estudio la FS no retornó a valores normales sino que siguió elevada.

Por otro lado, en los pacientes con infección natural, la proteinuria se asocia con un aumento de la FS y una reducción del PON-1. Nosotros, sin embargo, no hemos podido confirmar estos datos ya que como se ha mencionado anteriormente contamos con pacientes sin proteinuria con valores altos de ferritina y bajos de PON-1.

En nuestro estudio, en la visita del día 30 en el Grupo M, hemos encontrado una correlación positiva entre PON-1 y la densidad de la orina; es decir los pacientes que no concentran la orina tienen niveles bajos de PON-1. Este resultado coincide con los trabajos publicados en medicina humana en relación a este marcador de inflamación y la ERC. Los valores de PON-1 se han estudiado en el síndrome nefrótico humano encontrándose una reducción en pacientes proteinúricos en relación a los no proteinúricos. Además, el fallo renal crónico en humana se relaciona con un déficit de PON-1. El mecanismo patogénico por el cual se reduce PON-1 en la enfermedad renal no está claro, pero se piensa que puede ser debido a un aumento del estrés oxidativo y peroxidación lipídica. (Gugliucci y cols., 2012). En este sentido Ibba y cols (2015) comprobaron que aunque inicialmente eran bajos, los valores post-tratamiento de lipoproteína de alta densidad (HDL) aumentan correlacionándose positivamente con PON-1 y negativamente con la Prot. CR; de esta manera demostraron que la HDL puede usarse como un marcador adicional junto con la Prot. CR o el PON-1, para identificar y monitorizar en el tiempo la magnitud de la oxidación e inflamación en perros con leishmaniosis.

El descenso de PON-1 no ocurre de manera constante en la leishmaniosis posiblemente debido a que la magnitud de los fenómenos oxidativos varía de un caso a otro (Rossi y cols., 2014). Esto podría explicar por qué al inicio del estudio alguno de nuestros pacientes presentan valores dentro del rango de referencia y otros no.

El valor inicial de PON-1 no predice la evolución de la enfermedad pero cuando está bajo se normaliza antes que otros marcadores inflamatorios, proporcionando en un par de semanas una información útil sobre el curso de la enfermedad. Un valor inicial bajo de PON-1 nos debería hacer sospechar de una reacción inflamatoria más severa y su monitorización durante el

tratamiento, en comparación con otros marcadores de inflamación como la Prot. CR, puede ayudar a identificar a los pacientes que están respondiendo bien al tratamiento (Rossi y cols., 2014). Según este estudio podemos afirmar que los antimoniales son más efectivos que la miltefosina en el control de la inflamación asociada a la Leishmaniosis, en el periodo de tiempo valorado, ya que en este grupo el valor de PON-1 aumentó de manera significativa en todos los rangos de tiempo valorados.

Otra de las posibles causas de la reducción del valor de PON-1 en la ERC puede ser la azotemia. La reducción de los niveles de toxinas urémicas y el aumento de PON-1 en pacientes humanos sometidos a hemodiálisis hace pensar que estas toxinas pueden tener un papel en la inhibición de la enzima (Kotani y cols., 2011). En nuestro estudio no podemos atribuir el descenso de PON-1 a la azotemia puesto que sólo dos de los casos tenían elevación de la creatinina y cuatro de la urea en D0.

En un estudio realizado en perros con parvovirus los pacientes con enfermedad más severa tenían valores de PON-1 más altos que los que sufrían una enfermedad moderada o media. Esto puede deberse a que los pacientes más enfermos tengan un mayor efecto antioxidante protector. También los más enfermos suelen tener menor apetito, y un aumento de la movilización de lípidos lo que puede justificar el aumento de HDL-colesterol y PON-1 (Koukaturk y cols., 2014). En nuestro caso no hemos encontrado ninguna correlación entre la puntuación clínica y PON-1, sin embargo en la última visita del grupo M se observó una correlación positiva entre los glóbulos blancos y la paraoxonasa, que sí podría confirmar esta relación

La albúmina es considerada una proteína de inflamación aguda negativa que desciende durante los procesos inflamación mediante la reducción de su síntesis en el hígado. La correlación positiva encontrada entre PON-1 y la albúmina en ambos grupos en las visitas 30 y 90, indica que PON-1 actúa de la misma manera. Aunque como se ha comentado otra causa del descenso puede ser el estrés oxidativo.

En la visita del día 90 en el Grupo M encontramos una correlación positiva entre la paraoxonasa-1 y el calcio total. La proteína PON-1 en medicina humana se considera calcio dependiente, ubicando en el centro dos iones de calcio estructurales, cuya disociación puede dar lugar a la desnaturalización de la proteína. Esto podría explicar que en situaciones de reducción de calcio total, la proteína PON-1 disminuye también. De hecho recientemente se ha comprobado que los bloqueantes de los canales del calcio bloquean su actividad (Türkes y cols., 2014).

9.- CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

PRIMERA

Las características de la población de pacientes enfermos de leishmaniosis estudiada fueron perros adultos con signos clínicos compatibles con la enfermedad, títulos elevados de anticuerpos y en los que se evidenció el parásito de forma directa mediante diagnóstico molecular. Así mismo, las alteraciones clínicopatológicas más importantes encontradas fueron: anemia, hiperproteinemia con hipergammaglobulinemia e hipoalbuminemia.

En relación a la funcionalidad renal, la mayoría de los pacientes se clasificaron como IRIS I, con proteinuria y tasa de filtración glomerular y densidad urinaria dentro de la normalidad, aunque el valor de esta última fue inferior al esperado tras una privación de líquidos de doce horas.

SEGUNDA

En la población canina estudiada, los pacientes con leishmaniosis clínica presentaron niveles elevados de globulinas plasmáticas y de titulación inicial de anticuerpos asociadas a una mayor puntuación clínica; sin embargo, la reducción de esta última, considerada como mejoría del estado general, precedió a la normalización de la electroforesis de las proteínas plasmáticas y a la seroconversión, lo que confirma que la titulación de anticuerpos y los resultados del proteinograma no son parámetros útiles para valorar la respuesta clínica al tratamiento en un periodo de tres meses.

TERCERA

La reducción de la carga parasitaria después del tratamiento, valorada mediante la técnica de PCR cuantitativa, permitió identificar a los pacientes que presentaron una mejor respuesta clínica. No obstante, todos los pacientes estudiados continuaron siendo positivos mediante la técnica de PCR anidada; lo que supone que esta última tiene un valor importante en la confirmación de la infección mientras que la PCR cuantitativa se puede considerar una herramienta útil en el seguimiento de los pacientes después del tratamiento.

Con las muestras biológicas empleadas para llevar a cabo el diagnóstico molecular, la PCR anidada y cuantitativa demostraron mayor sensibilidad a partir de muestras de médula ósea. Por el contrario, la orina mostró una sensibilidad muy baja por lo que, en las condiciones

de nuestro estudio, no se puede considerar una muestra válida para cuantificar la carga parasitaria en perros con leishmaniosis, incluso con enfermedad renal declarada.

CUARTA

La evolución de las alteraciones laboratoriales en todos los pacientes incluídos en el estudio al cabo de tres meses fue favorable, aunque más significativa en los perros tratados con antimoniales, especialmente respecto a los valores del hemograma y de las proteínas plasmáticas.

El hallazgo en todos los pacientes de proteinuria y densidad urinaria en el límite inferior permiten aseverar que el análisis de estos dos parámetros (de fácil realización en la práctica clínica) es de gran importancia en todos los pacientes leishmaniósicos antes de iniciar el tratamiento, sobre todo desde un punto de vista pronóstico.

QUINTA

Ninguno de los dos fármacos evaluados en el tratamiento de pacientes con leishmaniosis clínica, antimoniales y miltefosina, afectaron significativamente a la funcionalidad renal, valorada mediante el análisis de la modificación del aclaramiento de creatinina exógena plasmática. No obstante, esta técnica permitió detectar enfermedad renal en algunos pacientes con leishmaniosis clínica, de ambos grupos, que mantuvieron valores normales de creatinina a lo largo de todo el periodo de estudio, lo que consolida a esta técnica como una valiosa herramienta diagnóstica en la valoración de la funcionalidad renal en pacientes proteinúricos no azotémicos.

SEXTA

La pérdida de proteínas por la orina antes del tratamiento, en la mayoría de los perros con leishmaniosis clínica estudiados fue patente, a pesar de mantener valores de filtración normal, como consecuencia del depósito de inmunocomplejos causantes de la enfermedad glomerular y no de los mecanismos adaptativos renales, como la hipertensión renal o la hipertrofia glomerular.

En este sentido, después del tratamiento con antimoniales se observó una mayor reducción de la proteinuria, hecho que puede relacionarse con un mejor control, a corto plazo, de la respuesta humoral y de sus consecuencias.

SÉPTIMA

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en orina mediante la técnica de SDS-PAGE permitió diferenciar las proteínas de alto y bajo peso molecular, lo que se considera de gran importancia para definir la localización de la lesión renal.

El incremento en la orina de la excreción de proteínas de bajo peso molecular en los perros después del tratamiento con antimoniales, no descarta una posible lesión renal tubular inducida por este leishmanicida, ni tampoco la posible presencia de inmunoglobulinas de cadena ligera, que sería necesario diferenciar mediante alguna técnica adicional.

Por su parte, en los pacientes tratados con miltefosina se demostró un aumento de la excreción de proteínas de elevado peso molecular en orina al final del periodo de estudio, lo que sugiere que este fármaco no reduce la lesión glomerular en un periodo de tres meses. Además, el aumento de las proteínas de bajo peso molecular en los pacientes tratados con antimoniales sugiere una lesión tubular asociada a un impacto orgánico de éste fármaco, resultado que no se demostró en los perros tratados con miltefosina.

y OCTAVA

El análisis de las proteínas de fase aguda y la evolución de las mismas permiten a corto plazo evaluar la evolución de la respuesta inflamatoria asociada a la leishmaniosis canina, incluso antes de que los cambios en la respuesta humoral sean detectables, considerándose por tanto un marcador de gran valor diagnóstico.

La evolución favorable de la mayoría de las proteínas de fase aguda analizadas después del tratamiento en los perros con leishmanosis clínica fue más significativo en el grupo tratado con antimoniales, a excepción de la haptoglobina, lo cual puede ser debido a una estimulación de la síntesis hepática de esta proteína. Estos resultados sugieren un mayor control inicial por este fármaco de la inflamación asociada a esta parasitosis.

10- BIBLIOGRAFIA

10.- BIBLIOGRAFÍA

Aisa MJ; Castillejo S; Gallego M; Fisa R; Riera MC; de Colmenares M; Torras S; Roura X; Sentis J; Portus M. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmania in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Med Hyg* 1998; 58:154-159.

Agarwal R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin II blockade. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F863-9.

Alfrey AC; Hegg A; Craswell P. Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure. *Am J Clin Nutr* 1980; 33:1509-1516.

Alfrey AC; LeGendre GR; Kaehny WD. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *N Engl J Med* 1976; 294:184-188.

Almeida BFM; Narciso LG; Melo LM; Preve PP; Bosco AM; Lima VMF; Ciarlini PC. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. *Vet J* 2013; 198: 599-605.

Almy FS; Christopher MM; King DP; Brown SA. Evaluation of Cystatin C as an Endogenous Marker of Glomerular Filtration Rate in Dogs. *J Vet Intern Med* 2002; 16:45-51.

Altintas A; Sahal M; Çelik S; Duru O; Ocal N. Determination of Serum and Urine Proteins by Electrophoresis and Its Importance in Clinical Veterinary Medicine. *Turk J Vet Anim Sci* 2000; 25: 93-104.

Alvar J; Cañavete C; Molina R; Moreno J; Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004; 57:1-88.

Anders HJ; Muruve DA. The inflammasomes in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011, 22:1007-1018.

Antognoni MT; Siepi D; Porciello F; Fruganti G. Use of Serum Cistatin C Determination as a Marker of Renal Function in the Dog. *Vet Res Commun* 2005, 29(Suppl. 2): 265-267.

Antognoni MT; Siepi D; Porciello F; Rueca F; Fruganti G. Serum Cystatin-C Evaluation in Dogs Affected by Different Diseases Associated or Not with Renal Insufficiency. *Vet Res Commun* 2007, 31(Suppl. 1): 269-271.

Aresu L, Benali S, Ferro S, Vittone V, Gallo E, Brovida C, Castagnaro M. Light and electron microscopic analysis of consecutive renal biopsy specimens from leishmania-seropositive dogs. *Vet Pathol*. 2013 Sep; 50 (5):753-60.

Aresu L; Pregel P; Bollo E; Palmerini D; Sereno A; Valenza F. Immunofluorescence staining for the detection of immunoglobulins and complement (C3) in dogs with renal disease. *Vet Rec* 2008;163:679-82.

Aresu L; Rastaldi MP; Pregel P; Valenza F; Radaelli E; Scanziani E; Castagnaro M. Dog as model for down-expression of E-cadherin and beta-catenin in tubular epithelial cells in renal fibrosis. *Virchows Arch* 2008b; 453: 617-25.

Baneth G; Koutinas A; Solano Gallego L; Bourdeau P; Ferrer L. Canine Leishmaniosis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. 2008; 24:324-330.

Baneth G; Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2002; 106: 315-324.

Baneth G; Solano-Gallego L. Global aspects of leishmaniosis: canine leishmaniosis. E: Greene C.C. (Ed.) *Infectious disease of the dog and cat*. 4 ed. Saunders Elsevier, St. Louis, 2012, pp:735-46.

Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2006; 28:329-337.

Barsanti JA; Finco DR. Protein concentration in urine of normal dogs. *Am J Vet Res* 1979; 40(11): 1583-1588.

Bazzi C; Petrini C; Rizza V; Arrigo G; Beltrame A y cols. Characterization of proteinuria in primary glomerulonephritides. SDS-PAGE patterns: clinical significance and prognostic value of low molecular weight ("tubular") proteins. *Am J Kidney Dis* 1997; 29:27-35.

Beatrice L; Nizi F; Callegari D; Paltrinieri S; Zini E; D'Ippolito P; Zatelli A. Comparison of urine protein-to-creatinine ratio in urine samples collected by cystocentesis versus free catch in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 11: 1221-1224.

Belloli C; Ceci L; Carli S; Tassi P; Montesissa C; De Natale G; Marco-trigiano G; Ormas P. Disposition of antimony and aminosidine in dogs after administration separately and together: implications for therapy of leishmaniasis. *Res Vet Sci* 1995; 58:123-27.

Benderitter T; Casanova P; Nashkidachvili L; Quilici M. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1988, 82:335-341.

Beristain-Ruiz DM; Carretón E; Rodríguez-Alarcón CA; Montoya-Alonso JA; Barrera R. SDS-PAGE analysis of urinary proteins in dogs with heartworm disease. *IJVR* 2013; 14(3):245-249.

Berman J. Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert Opin Pharmac* 2005; 6:1381-88.

Bernard AM; Vyskocil AA; Mahieu P y cols. Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. *Clin Chem* 1987; 33:775-779.

- Bianciardi P; Brovida C; Valente M; Aresu L; Cavicchioli L; Vischer C; Giroud L; Castagnaro M. Administration of Miltefosine and Meglumine Antimoniate in Healthy Dogs: Clinicopathological Evaluation of the Impact on the Kidneys. *Toxicol Pathol* 2009; 37: 770-775.
- Bianciardi P; Fasanella A; Foglia Manzillo V; Trotta T; Pagano A; Sorino S; Gradoni L, Oliva G. The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. *Parasitol Res* 2004; 93:486-492.
- Biewenga WJ; Gruys E. Proteinuria in the dog: a clinicopathological study in 51 proteinuric dogs. *Res Vet Sci* 1986; 41:257-264.
- Blavier A; Keroack S; Denerrolle PH; Goy-Thollot I; Chabanne L y cols. Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J* 2001; 162: 108-120.
- Boal S; Carreira LM. Serum and synovial fluid C-reactive protein level variations in dogs with degenerative joint disease and their relationships with physiological parameters. *Vet Res Commun* 2015, 39:163-169.
- Bonfanti U; Zini E Minetti E; Zatelli A. Free Light-Chain Proteinuria and Normal Renal Histopathology and Function in 11 Dogs Exposed to *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia canis*. *J Vet Intern Med* 2004; 18:618-624.
- Bourdeau P; Saridomichelakis MN; Oliveira A; Oliva G; Kotnik T; Gálvez R; Foglia Manzillo V; Koutinas AF; Pereira da Fonseca I; Miro G. Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions: a questionnaire-based multinational survey. *Parasit Vectors* 2014; 7: 110.
- Brandeker E; Hillström A; Hanås S; Hagman R; and Ström Holst B. The effect of a single dose of prednisolone in dogs envenomated by *Vipera berus* – a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *BCM Vet Research* 2015; 11:44.
- Braun JP; Lefebvre HJ. Kidney function and damage. En Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Sexta ed: Oxford; Elsevier 2008; pp: 485-528.
- Braun JP; Lefebvre HP; Watson AD. Creatinine in the dog: a review. *Vet Clin Pathol* 2003; 32: 162-179.
- Brown AL; Shiel RE; Irwin PJ. Clinical, haematological, cytokine and acute phase protein changes during experimental *Babesia gibsoni* infection of beagle puppies. *Exp Parasitol* 2015; 157:185-196.
- Brown N; Segev G; Francey T; Kass P; Cowgill LD. Glomerular Filtration Rate, Urine Production, and Fractional Clearance of Electrolytes in Acute Kidney Injury in Dogs and Their Association with Survival. *J Vet Intern Med* 2015; 29:28–34.

- Brown S, Atkins C, Bagley R, Carr A, Cowgill L, Davidson M y cols. Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. ACVIM Consensus Statement. J Vet Intern Med 2007; 21:542–558.
- Brown SA. Oxidative stress and chronic kidney disease. Vet Clin Small Anim 2008; 30: 157-166.
- Brown SA; Brown CA; Jacobs G; Stiles G; Hendi RS; Wilson S. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor benazepril in cats with induced renal insufficiency. Am J Vet Res 2001, 62 (3): 375-383.
- Brown SA; Crowell WA; Barsanti JA y cols. Beneficial effects of dietary mineral restriction in dogs with marked reduction of functional renal mass. J Am Soc Nephrol 1991; 1:1169-1179.
- Brown S; Elliott J; Francey T; Polzin D; Vaden. Consensus Recommendations for Standard Therapy of Glomerular Disease in Dogs IRIS Canine GN Study Group Standard Therapy Subgroup. J Vet Intern Med 2013; 27:S27–S43
- Brown SA; Finco RD; Brown CA; Crowell WA; Alva R; Ericsson GF y cols. Evaluation of the effects of inhibition of angiotensin converting enzyme with enalapril in dogs with induced chronic renal insufficiency. Am J Vet Res 2003, 64(3): 321-327.
- Brunker JD; Ponzio NM; Payton ME. Indices of urine N-acetyl- β -D-glucosaminidase and γ glutamyl transpeptidase in clinically normal adult dogs. Am J Vet Res 2009; 70:297–301.
- Buckalew VM Jr; Berg RL; Wang S y cols. Prevalence of hypertension in 1795 subjects with chronic renal disease: the modification of diet in renal disease study baseline cohort. Modification of diet in renal disease study group. Am J Kidney Dis 1996; 28(6):811-21.
- Bugbee AC; Coleman AE; Wang A; Woolcock AD; Brown SA. Telmisartan treatment of refractory proteinuria in a dog. J Vet Intern Med 2014; 28:1871–1874.
- Buono A; Duque J; Ferlizza E; Zaragoza C; Barrera R; Isani G; Dondi F. Non-invasive diagnostic evaluation including qualitative proteinuria to detect an early renal damage in canine leishmaniasis. Oral Research Communications of the 22nd ECVIM-CA Congress. J Vet Intern Med 2012; 26:1505-1538.
- Cannata-Andía JB, Rodríguez-García M, Román-García P, Tuñón-le Poultel D, López-Hernández F, Rodríguez-Puyol D. New therapies: calcimimetics, phosphate binders and vitamin D receptor activators. Pediatr Nephrol 2010; Febrero.
- Caragelasco DS; Kogika MM; Martorelli CR; Waki MF; Kanayama KK; Simoes DMN. Qualitative evaluation of urinary proteins by sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gradient

gel electrophoresis (SDS-PAGE) during the treatment of dogs with hyperadrenocorticism (HAC). *J Vet Intern Med* 2013; 27(3): 690-690.

Cardoso L; Shallig HD; Cordeiro-Da-Silva A; Cabral M; Alunna JM; Rodriguez M. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 117:35-41.

Cavalcante CZ; Kogika MM; Bacic A; Santoro ML. Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a pressão arterial sistêmica. *Pesq Vet Bras* 2013; 33(11):1357-1363.

Cerón JJ; Caldin M; Martinez-Subiela S. Proteínas Plasmáticas. In: Cerón, J.J. (Ed.), *Análisis clínicos en pequeños animales*. Inter-Médica, Buenos Aires 2013; pp. 91–104.

Cerón JJ; Eckersall PD; Martinez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats. Current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol* 2005; 34:85-99.

Cerón JJ; Martinez-Subiela S; Ohno K; Caldin M. A seven-point plan for acute phase protein interpretation in companion animals. *Vet J* 2008; 177:6-7.

Chew DJ; Dibartola SP, Schenck PA. Chronic renal failure. *Canine and feline nephrology and urology*. 2ª ed. US: Elsevier Saunders; 2011, pp:145-196.

Ciaramella P; Corona M. Canine leishmaniasis: therapeutic aspects. *Comp Cont Educ Pract* 2003;25:370-375.

Ciaramella P; Oliva G; De Luna R; Gradoni L; Ambrosio R; Cortese L; Scalone A; Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum* *Vet Rec* 1997; 141:539-543.

Cook AK; Cowgill LD. Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: a review of 137 cases (1985-1992). *J Am Anim Hosp Assoc* 1996; 32:313-322.

Cortadellas O. Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis. *J Vet Intern Med* 2003; 17:808-812.

Cortadellas O; Fernandez de Palacio MJ; Bayón A; Albert A; Talavera J. Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *J Vet Intern Med* 2006; 20:941-947.

Cortadellas O; Fernández del Palacio MJ, Talavera J, Bayón A. Glomerular Filtration Rate in Dogs with Leishmaniasis and Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med* 2008; 22:293-300.

- Cortadellas O; Fernandez de Palacio MJ; Talavera J; Bayón A. Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniosis at different stages of chronic kidney disease. *Vet Rec* 2009; 18:487-490.
- Cortadellas O; Talavera J; Fernández del Palacio MJ. Evaluation of the Effects of a Therapeutic Renal Diet to Control Proteinuria in Proteinuric Non-Azotemic Dogs Treated with Benazepril. *J Vet Intern Med* 2014; 28:30–37.
- Costa FA; Goto H; Saldanha LC; Silva SM; Sinhorn IL; Silva TC; Guerra JL. Histopathologic patterns of nephropaty in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol* 2003; 40(6): 677-84.
- Costa FA; Prianti MG; Silva TC; Silva SM; Guerra JL; Goto H. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. *BMC Infect Dis* 2010; 10:112.
- Croft SL; Snowdon D; Yardley V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:1041-1047.
- D'Amico G; Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int* 2003; 63:809-825.
- Daher EF; Rocha NA; Oliveira MJC; Franco LFLG; Oliveira JL; Silva Junior GB; Abreu KLS; Henn GAL; Martins AMC; Libório AB. Renal Function Improvement with Pentavalent Antimonial Agents in Patients with Visceral Leishmaniasis. *Am J Nephrol* 2011; 33:332-336.
- Dantas-Torres F: The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; 149: 139-146
- Davidson RN. Practical guide for the treatment of Leishmaniasis. *Drugs* 1998; 56: 1009-1018.
- Davidson RN; den Boer M; Ritmeijer K. Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 653-660.
- Darling IM; Morris ME. Evaluation of 'true' creatinine clearance in rats reveals extensive renal secretion. *Pharmaceutical Research* 1991; 8: 1318-1322.
- De Loor J; Daminet S; Smets P; Maddens B; Meyer E. Urinary biomarkers for acute kidney injury in dogs. *J Vet Intern Med* 2013; 27:998–1010.
- Denerolle P; Bourdoiseau G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniosis (96 cases). *J Vet Intern Med* 1999; 13: 413-145.

de Oliveira RA, Diniz LFB, Teotonio LO, Lima CG, Mota RMS, Martins A, Sanches TR, Seguro AC, Andrade L, Silva GBJr, Liborio AB, Daher EF. Renal tubular dysfunction in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Kidney Int* 2011; 80, 1099–1106.

Dibartola SP: Applied renal physiology. In *Fluid, electrolyte and acid-base disorders in small animal practice*. Fourth edition. Elsevier Saunders. 2012; Pp: 26-41.

Dieterle F; Sistare F; Goodsaid F; Papaluca M; Ozer JS y cols. Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMA and predictive safety testing consortium. *Nature Biotechnology* 2010; 28: 455-462.

Dutcher J; Young M; Sheridan J; Hibbits W; Walters D. Chemical studies on amphotericin B.I. Preparation of the hydrogenation product and isolation of mycosamine, an acetolysis product. *Antibiot Annu* 1956; 866-869.

Duffy ME; Specht A; Hill RC. Comparison between urine protein: creatinine ratios of samples obtained from dogs in home and hospital settings. *J Vet Intern Med* 2015; 1-7.

Eckershall PD; Bell R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J*. 2010; 185:23–27.

Edison ES, Bajel A, Chandy M. Iron homeostasis: new players, newer insights. *Eur J of Haematol* 2008; 81: 411-424.

Eddy AA. Can renal fibrosis be reversed?. *Pediatr Nephrol*. 2005 Oct;20(10):1369-75.
Epub 2005 Jun 10.

Esch K; Schaut RG; Lamb IM; Clay G; Morais Lima AL; do Nascimento PRP; Whitley EM; Jeronimo SMB; Sutterwala FS; Haynes JS; Petersen CA. Activation of Autophagy and NLR Family, Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome during *Leishmania infantum*–Associated Glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2015; 185(8): 2015-17.

Feldman BF. Non-regenerative anemia. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6th Edit., SJ Ettinger, EC Feldman, Eds., Elsevier Saunders, St Louis, pp: 1908-1917.

Fernández M; Coll E; Ventura S; Bermudo C; Cárdenas MC, Cortés M y cols. Cistatina C en la evaluación de la función renal. *Rev Lab Clin* 2011; 4(1):50-62.

Fernández-Bellón H; Solano-Gallego L; Rodríguez A; Rutten VP; Hoek A; Ramis A; Alberola J; Ferrer L. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005; 107:163-169.

Fernández-Pérez FJ; Méndez S; de la Fuente C; Cuquerella M; Gómez MT; Alunda JM. Value of Western blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11:170-173.

- Ferrer L; Aisa MJ; Roura X; Portus M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec* 1995; 136:514-516.
- Finco DR. Evaluation of renal functions. *Canine and feline nephrology and urology*. Williams and Wilkins, Baltimore 1995; pp: 216-229.
- Finco DR. Association of systemic hypertension with renal injury in dogs with induced renal failure. *J Vet Intern Med* 2004; 18(3):289-194.
- Finco DR; Braselton WE; Cooper TA. Relationship between Plasma Iohexol Clearance and Urinary Exogenous Creatinine Clearance in Dogs. *J Vet Intern Med* 2001; 15:368–373.
- Finco DR; Brown SA; Crowell WA y cols. Effects of dietary phosphorus and protein in dogs with chronic renal failure. *Am J Vet Res* 1992; 53:2264-2271.
- Finco DR; Brown SA; Vaden SL y cols. Relationship between plasma creatine concentration and glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 1995; 18:418-421.
- Foglia Manzillo V; Di Muccio T; Cappiello S; Scanole A; Paparcone R; Fiorentino E; Gizzarelli M; Gramiccia M; Gradoni L; Oliva G. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naive dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 May 9; 7(5):e2225.
- Fortin A; Bosschaerts T; Hernández L; Montoya A; Gálvez R; Dado D; Checa R; Bello A; Jansen H; Miro G. Short oral treatment with oleylphosphocholine improves clinical canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a natural model of infection. In *World Leish 5 congress* pp: O-342. Brazil 2013.
- Francino O; Altet L; Sánchez-Robert E; Rodríguez A; Solano-Gallego L; Alberola J; Ferrer L; Sánchez A; Roura X. Advantages of the real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2006; 137:214-221.
- Franceschi A; Merildi V; Guidi G; Mancianti F. Occurrence of *Leishmania* DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis. *Vet Res Commun* 2007; 31:335-341.
- Fransson BA; Lagerstedt AS; Bergstrom A; Hagman R; Park JS; Chew BP; Evans MA; Ragle CA. C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. *J Vet Emerg Crit Care* 2007; 17(4): 373-381.
- Gallardo F; Gallardo MB; Cabra MJ; Ramírez G; Barón JJ; Prieto MA. Disorders of iron metabolism and anemia in critically ill patients. *Anemia Revista* 2008; 2: 97-102
- García-Martínez JD; Martínez-Subiela S; Tvarijonaviciute A; Caldin M; Ceron JJ. Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. *Res Vet Sci* 2015; 99: 204-207.

Gebhardt C; Hirschberger J; Rau S; Arndt G; Krainer K; Schweigert FJ; Brunnberg L; Kaspers B; Kohn B. Use of C-reactive protein to of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *J Vet Emerg Crit Care* 2009; 19(5):450-458

Geddes RF; Fich NC; Syme HM; Elliot H. The role of phosphorus in the pathophysiology of chronic kidney disease. *J Vet Emerg Crit Care* 2013; 23 (2): 122-133.

Giblett ER. The haptoglobin system. *Ser Haematol* 1968; 1:3-20

Giraud P; Bernard D; Orsini A; Coignet J. Leishmaniose viscérale infantile méditerranéenne. *Rev Med* 1970; 18:1055-64.

Giori L; Tricomi FM; Zatelli A; Roura X, Paltrinieri S. High-resolution gel electrophoresis and sodium dodecyl sulphate–agarose gel electrophoresis on urine samples for qualitative analysis of proteinuria in dogs. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23(4) 682-690.

Gómez-Ochoa P; Castillo JA; Gascón M; Zarate JJ; Alvarez F; Couto GC. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *Vet J* 2009; 259-263.

Goldstein RE; Brovida C; Fernandez-del Palacio MJ; Littman MP; Polzin DJ; Zatelli A; Cowgill LD: Consensus Recommendations for Treatment for Dogs with Serology Positive Glomerular Disease. *J Vet Intern Med* 2013; 27:S60–S66.

Gommeren K; Van Hoek I; Lefebvre HP; Benchekroun G; Smets P; Daminet S. Effect of Thyroxine Supplementation on Glomerular Filtration Rate in Hypothyroid Dogs. *J Vet Intern Med* 2009;23:844–849.

Goy-Thollot I; Besse S; Garnier F; Marignan M; Barthez PY. Simplified Methods for Estimation of Plasma Clearance of Iohexol in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med* 2006; 20:52–56.

Gradoni L; Gramiccia M; Scalone A. Visceral leishmaniasis treatment, Italy. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:1617-1620.

Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol* 2011; 181:23-30.

Grauer G.F; CVT Update. Canine glomerulonephritis, in: Bonagura J.D. (Ed.), *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII*, W.B.Saunders Company, Philadelphia, 2000, pp.851-853.

Grauer GF; Greco DS; Behrend EN y cols. Estimation of quantitative enzymuria in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicosis using urine enzyme/creatinine ratios from spot urine samples. *J Vet Intern Med* 1995;9:324-327.

Grauer GF, Greco DS, Getzy DM y cols. Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. *J Vet Intern Med* 2000;14:526–533.

Greco DS; Turnwald GH; Adams R y cols. Urinary γ -glutamyl transpeptidase activity in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. *Am J Vet Res* 1985; 46:2332–2335.

Gruys E; Toussaint M J; Niewold TA y cols. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 6 2015; 1045-1056.

Gugliucci A; Kotani K; Kimura S. Paraoxonase 1 in chronic kidney failure. *J Lipids* 2012; 2012:726048.

Guy M; Bailey W; Snowden K. Canine leishmaniasis. *Vet Record* 1993; 132, 396.

Hall JA; Yerramilli M; Obare E; Yerramilli M; Melendez LD; Jewell DE. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2015;29:808-814.

Hand; Thatcher; Remillard, Roudebush. *Nutrición clínica en pequeños animales*. Buenos Aires: ed Intermedica 2000; pp: 268-298.

Hantson P; Luyasu S; Haufroid V; Lambert M. Antimony excretion in a patient with renal impairment during meglumine antimoniate therapy. *Pharmacotherapy* 2000; 20:1141-43.

Harvey JW: Iron metabolism and its disorders. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th Edit., JJ Kaneko, JW Harvey, ML Bruss, Ed., Academic Press, San Diego, pp: 259-285.

Harvey JW, West CL. Prednisone-induced increases in serum alpha-2-globulin and haptoglobin concentrations in dogs. *Vet Pathol* 1987; 24:90–92.

Harvey DG; Hou CM: The use of paper electrophoresis for the routine identification of urinary proteins in the dog. *J Small Anim Pract* 1966; 7:431-440.

Heidarpour H; Soltani S; Mohri M; Khoshnegah J. Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. *Parasitol Res* 2012; 111(4):1491-6.

Heiene R; Moe L. Pharmacokinetic aspects of measurement of glomerular filtration rate in the dog. *J Vet Intern Med* 1998; 12:401-414.

Helal I; Fick-Brosnahan GM; Reed-Gitomer B; Schrier RW. Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanism and clinical implications. *Nature Reviews* 2012; 8:293-300.

Hernández L; Gálvez R; Montoya A; Checa R; Bello A; Bosschaerts T; Jansen H; Rupérez C; Fortin A, Miró G. First study on efficacy and tolerability of a new alkylphosphocholine molecule (oleylphosphocholine-OIPC) in the treatment of canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Parasitol Res* 2014; 113(1):157-64.

- Hernández L; Llamas M; Ribas F; Montoya A; Checa R; Sagredo P; Rupérez C; Fraile C; Gálvez R; Pulido P; Vázquez M; Arevalo F; Punzón C; Fresno M; Miró G. Eficacia clínica y parasitológica de Leishtop ® una vacuna específica en la inmunoterapia de la leishmaniosis canina: resultados preliminares. In XXX Congreso Anual de AMVAC Madrid.
- Hernández L; Montoya A; Checa R; Dado D; Gálvez R; Otrando D; Latrofa MS; Baneth G; Miró G. Course of experimental infection of canine leishmaniosis: Follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. *Vet Parasitol* 2015; 207:149-155.
- Hilgard P; Klenner T; Stekar J; Unger C. Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents. *Cancer Chemoter Pharmacol* 1993;32: 90-95.
- Holm JL; Rozanski EA; Freeman LM; Webster CRL. C-reactive protein concentrations in canine acute pancreatitis. *J Vet Emerg Crit Care* 2004; 14(3):183-186
- Hormaeche H; Carretó E; González-Miguel J; Gussoni S, Montoya-Alonso JA, Simón F, Morchón R. Proteomic analysis of the urine of *Dirofilaria immitis* infected dogs. *Vet Parasitol* 2014; 203:241-246.
- Hostetter TH; Olson JL; Rennke HG; Venkatachalam MA; Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol.* 1981 Jul; 241(1):F85-93.
- Hsu WL; Lin YS; Hu YY; Wong ML, Lin FY; Lee YJ. Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin in Dogs with Naturally Occurring Renal Diseases. *J Vet Intern Med* 2014; 28:437–442.
- Huang, S. H. et al. Hyperfiltration affects accuracy of creatinine eGFR measurement. *Clin. J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 274-280.
- Hutchison AJ, Maes B, Vanwalleghe J, Asmus G, Mohamed E, Schmieder R y cols. Efficacy, tolerability, and safety of lanthanum carbonate in hyperphosphatemia: a 6-month, randomized, comparative trial versus calcium carbonate. *Nephron Clin Pract* 2005; 100:c8–c19.
- Ibba F; Rossi G; Meazzi S; Giordano A; Paltrinieri S. Serum concentration of high density lipoproteins (HDLs) in leishmaniotic dogs. *Res Vet Sci* 2015; 98: 89-91.
- Ikeda-García FA; Lopes RS; Ciarlini PC; Marques FJ; Lima VMF; Perri SHV; Feitosa MM. Evaluation of renal and hepatic function in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Res Vet Sci* 2007; 83:105-108.
- Ishioka K; Omachi A; Sagawa M; Shibata H; Honjoh T; Kimura K, Saito M. Canine adiponectin: cDNA structure, mRNA expression in adipose tissues and reduced plasma levels in obesity. *Res Vet Sci* 2006; 80, 127–132.

Israni AK; Kasiske BL. Laboratory Assessment of Kidney Disease: Glomerular Filtration Rate, Urinalysis, and Proteinuria. Brenner & Rector's The Kidney 9th Edition. 2012 pp 868-896.

Izzat NN; Rosborough JP. Renal function in conscious dogs: Potential effect of gender on measurement. Res Exp Med 1989; 189:371-379.

Jacob F; Polzin DJ; Osborne CA y cols. Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic renal failure in dogs. J Am Vet Med Assoc 2002; 220(8):1163-70.

Jacob F; Polzin DL; Osborne CA; Neaton JD; Lekcharoensuk C, Allen TA y cols. Association between initial systolic blood pressure and risk of developing a uremic crisis or of dying in dogs with chronic renal failure. J Am Vet Med Assoc 2003; 222(3): 322-329.

James KM; Lunn KF. Normal and Abnormal Water Balance: Hyponatremia and Hypernatremia. Compendium October 2007: 580-609.

Jens R; Brunnberg L; Schweigert FJ; Kohn B. Influence of kidney function on urinary excretion of albumin and retinol-binding protein in dogs with naturally occurring renal disease. Am J Vet Res 2010; 71(11): 1387-1394.

Johnson RJ; Couser WG; Chi EY; Adler S; Klebanoff SJ. New mechanism for glomerular injury: myeloperoxidase hydrogen peroxide-halide system. J Clin Invest 1987; 79:1379-1387.

Kalantar-Zadeh K; Kalantar-Zadeh K; Lee H. The fascinating but deceptive ferritin: to measure it or not to measure it in chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol 2006; 1:S9-18.

Katlama C; Regnier B; Ben Salah N; Pichard D; Vachon F. Toxicité du glucantime. Ann Med Int 1985; 136: 321-2.

King JN, Tasker S, Gunn-Moore DA, Strehlau G y el BENRIC (benazepril in renal insufficiency in cats). Study Group Prognostic Factors in Cats with Chronic Kidney Disease. J Vet Intern Med 2007; 21:906-916.

Kinsky SC. Antibiotic interaction with model membranes. Annu Rev Pharmacol 1970; 10:119-142.

Kocaturk M; Martinez S; Eralp O; Tvarijonaviciute A, Ceron J y cols. Prognostic value of serum acute phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. J Small Anim Pract 2010; 51: 478-483.

Kocaturk M; Tvarijonaviciute A; Martinez-Subiela S; Tecles F; Eralp O; Yilmaz Z; Ceron JJ. Inflammatory and oxidative biomarkers of disease severity in dogs with parvoviral enteritis. J Small Anim Pract 2015; 56: 119-124.

- Kogika MM; Lustoza MD; Hagiwara MK; Caragelasco DS; Martorelli CR; Mori CS. Evaluation of oxidative stress in the anemia of dogs with chronic kidney disease. *Vet Clin Pathol* 2015; 44(1): 70-78.
- Kotani K; Kimura S; Gugliucci P. Paraoxonase-1 and ischemia modified albumin in patients with end stage renal disease. *J Physiol Biochem* 2011; 67:437-441.
- Koutinas AF; Kontos V; Kaldrimidou H; Lekkas S. Canine leishmaniasis associated nephropathy: a clinical, clinicopathologic and pathologic study in 14 spontaneous cases with proteinuria. *EJCAP* 1999; 5:31-38.
- Koutinas AF; Polizopoulou ZS; Saridomichelakis MN; Argyriadis D; Fytianou A; Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989–1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 1999; 35: 376-83.
- Kralova S; Leva L; Toman M. Changes in lymphocyte function and subsets in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Can J Vet Res* 2010; 74:124–129.
- Krawiec DR; Badertscher RR; Twardock AR y cols. Evaluation of ^{99m}Tc-diethylenetriaminepentaacetic acid nuclear imaging for quantitative determination of the glomerular filtration rate in dogs. *Am J Vet Res* 1986; 47:2175-2179.
- Kumar V, Gour JK, Bajpai S, Mishra M, Singh RK. Detection of urinary antigens and their seroreactivity with serum of patients in *Leishmania donovani* infection. *Asian Pac J Trop Med* 2011; 367-370.
- Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685; 1970).
- La guía WALTHAM para recortar y guardar La prueba de aclaramiento de creatinina plasmática exógena (PACPE): aspectos prácticos y recomendaciones. *Waltham Focus* 2005; 15(1):38-39
- Lamothe J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract* 2001; 42: 170-175.
- Langlois M; Delanghe J. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996; 42: 1589-1600.
- Laroute V; Lefebvre HP; Costes G; Toutain PL. Measurement of glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in the conscious beagle dog by single intravenous bolus of iohexol and p-aminohippuric acid. *J Pharmacol Toxicol* 1999; 41: 17-25.

Lees GE; Brown SA; Elliot J; Grauer GF; Vaden SL. Assessment and management of proteinuria in dogs and cat: 2004 ACVIN forum consensus statement (small animal). *J Vet Intern Med* 2005; 19:377:385.

Lees GE; Jensen WA; Prause L y cols. Persistent albuminuria precedes onset of overt proteinuria in male dogs with X-linked hereditary nephropathy. *J Vet Med* 2002; 16:352.

Lefebvre HP; Dossin O; Trumel C; Braun JP. Fractional excretion tests: a critical review of methods and applications in domestic animals. *Vet Clin Pathol* 2008; 37(1): 4–20.

Lefebvre HP; Toutain PL. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in the therapy of renal diseases. *J Vet Pharmacol Ther* 2004, 27: 265–281.

Lima Verde FAA, Lima Verde FA, Lima Verde IA, Silva Júnior GB, Daher EF, Lima Verde EM. Evaluation of renal function in human visceral leishmaniasis (kala-azar): a prospective study on 50 patients from Brazil. *J NEPHROL* 2007; 20: 430-436.

Linnetz EH; Graves TK. Glomerular Filtration Rate in General Small Animal Practice. *Compend Cont Educ Pract Vet* 2010; October E1-E5.

Lippi I; Guidi G; Marchetti, V; Tognetti R; Meucci V. Prognostic role of the product of serum calcium and phosphorus concentrations in dogs with chronic kidney disease: 31 cases (2008–2010).

Littman MP; Daminet S; Grauer GF; Lees GE; van Dongen AM. Consensus Recommendations for the Diagnostic Investigation of Dogs with Suspected Glomerular Disease. *J Vet Intern Med* 2013; 27:S19-S26.

Littman MP; Robertson JL; Bovee KC. Spontaneous systemic hypertension in dogs: Five cases (1981-1983). *J Am Vet Med Assoc* 1988; 193:486-494.

Lombardo G; Pennisi MG; Lupo T; Migliazzo A; Capri A; Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctiva swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet Parasitol* 2012; 28:184 (1):10-7.

Luciani A; Sconza S; Civitella C; Guglielmini C. Evaluation of the cardiac toxicity of N-methyl-glucamine antimoniate in dogs with naturally occurring leishmaniasis. *Vet J* 2013; 196:119-121.

Lux H; Heise N; Klenner T; Hart D; Opperdoes FR. Ether lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 111:1-14.

McCown JL, Specht AJ. Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. *J Am Anim Hosp Assoc* 2011; 47:51-160.

Mackness MI; Arrol S; Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides on low-density lipoprotein. *FEBS Letters* 1991; 286: 152–154

Maddens BE; Daminet S; Demeyere K; Demon D; Smets P y cols. Validation of immunoassays for the candidate renal markers C-reactive protein, immunoglobulin G, thromboxane B2 and retinol binding protein in canine urine. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 134:259-264.

Maeda K; Okubo K; Shimomura I; Funahash T; Matsuzawa Y; Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (Adipose Most abundant Gene transcript 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; 221, 286–289.

Maggio F, DeFrancesco TC, Atkins CE y cols. Ocular lesions associated with systemic hypertension in cats: 69 cases (1985-1998). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217:695–702

Maia C; Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 2008; 158:274-287.

Manna L; Corso R; Galiero G; Cerrone A; Muzj P; Gravino AE. Long term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasit Vectors* 2015; 8(289).

Manna L; Reale S; Picillo E; Vitale F; Gravino AE. Urine sampling for real-time polymerase chain reaction based of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20:64-67.

Marcondes M; Lima VM; de Araújo MeF; Hiramoto RM; Tolezano JE; Vieira RF; Biondo AW. Longitudinal analysis of serological test officially adopted by the Bazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. *Vet Parasitol* 2013; 197:649-652.

Martínez-Subiela S; Cerón JJ; Strauss-Ayalib D; Garcia-Martinez JD, Teclesa F; Tvarijonaviciute A, Caldinc M; Baneth G. Serum ferritin and paraoxonase-1 in canine leishmaniosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2014; 37:23-29.

Martínez-Subiela S; Bernal LJ; Cerón JJ. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *Am J Vet Res* 2003; 64 (8): 1021-1026.

Martinez-Subiela S; Dalit Strauss-Ayalib D; Cerón JJ, Baneth G. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2011; 180: 197-202.

Martínez-Subiela S; Parra ND; Ceron JJ. Principales aplicaciones de las proteínas de fase aguda en la clínica canina. *An Vet (Murcia)* 2004; 20:75-86.

Martínez-Subiela S; Tecles F; Eckersall PD; Ceron JJ. Serum concentration of acute phase proetins in dogs with leishmaniosis. *Vet Rec* 2002; 23:241-244.

Martorelli CR; Kogika MM; Waki MF; Caragelasco DS.; Simoes DMN, Kanayama KK. Qualitative and quantitative evaluation of urinary proteins by sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis (SDSPAGE) and albumin-to-creatinine ratio in dogs with diabetes mellitus. *J Vet Intern Med* 2013; 27 (3): 693-694.

Masmoudi A; Maalej N; Mseddi M; Souissi A; Turki H; Boudaya S; Bouassida S; Zahaf A. Glucantime® par voie parentérale: bénéfice versus toxicité Glucantime® injection: benefit versus toxicity. *Med Mal Infect* 2005; 35: 42-45.

Matera L; Mori M: Cooperation of pituitary hormone prolactin with interleukin-2 and interleukin-12 on production of interferon-gamma by natural killer and T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:505-513.

Mateo M. Estudios sobre la eficacia comparada y la tolerancia de la miltefosina y el antimonio de n-metilglucamina, y la monitorización post-tratamiento con alopurinol en la infección natural por "Leishmania infantum" en el perro. Tesis Doctoral 2007

Mateo M; Maynard L; Vischer C; Bianciardi P; Miro G. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniasis. *Parasitol Res* 2009; 105:155-162.

Matijatko V; Mrljak V; Kis I; Kucer N; Forsek J; Zivicnjak T; Romić Z; Simec Z; Ceron JJ. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet Parasitol* 2007; 144: 242-250.

Matsumoto Y; Shinzato T; Amano I y cols. Relationship between susceptibility to apoptosis and Fas expression in peripheral blood T cells from uremic patients: A possible mechanism for lymphopenia in chronic renal failure. *Biochem Biophys Res Com* 1995; 215:98–105.

Mayer-Roenne B, Goldstein RE, Erb HN. Urinary tract infections in cats with hyperthyroidism, diabetes mellitus and chronic kidney disease. *J Fel Med Surg* 2007; 9: 124-132.

Meléndez Lázaro A; Tvarijonaviciute A; Ceron JJ; Planellas M; Pastor J. Evaluation of the relationship between selected reticulocyte parameters and inflammation determined by plasma C reactive protein in dogs. *J Comp Path* 2015; 132; 304-312.

Méndez JC; Carretón E; Martínez S; Tvarijonaviciute A; Cerón JJ; Montoya-Alonso JA. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Vet Parasitol* 2014; 420-425.

Merlo A; Rezende BCG; Franchini ML; Simões DMN; Lucas SGR. Serum C-reactive protein concentrations in dogs with multicentric lymphoma undergoing chemotherapy. *JAVMA* 2007; 230 (4): 522-526.

- Mettler M; Grimm F; Capelli G; Camp H; Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid test (immunochromatographic-distick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11):5515-9.
- Michell AR, Bodey AR, Gleadhill A. Absence of hypertension in dogs with renal insufficiency. *Ren Fail* 1997; 19:61–68.
- Miro G: Tratamiento y pronóstico. En: *Leishmaniosis: una revisión actualizada*. Zaragoza: Ed.Servet. 2014, pp:151-64.
- Miro G; Oliva G; Cruz I; Cañavate C; Mortarino M; Vischer C; Bianciardi P. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol* 2009; 20: 397-404.
- Mitani S; Yabuki A; Sawa M; Chang HS; Yamato O: Intrarenal Distributions and Changes of Angiotensin-Converting Enzyme and Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Feline and Canine Chronic Kidney Disease. *J Vet Med Sci* 2014; 76(1): 45–50.
- Moe L; Heiene R. Estimation of glomerular filtration rate in dogs with 99 M-Tc DTPA and iothexol. *Res Vet Sci* 1995; 58:138-143.
- Molina R; Amela C; Nieto J; San-Andrés M; González F; Castillo JA; Lucientes J; Alvar J; Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88:491-493.
- Mozos E; Perez J; Day MJ; Lucena R; Ginel PJ. Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study. *J Comp Pathol* 1999; 120:257-268.
- Murray HW. Suppression of posttreatment recurrence of experimental visceral leishmaniosis in T-cell deficient mice by oral miltefosine. *Antimicrob Agents Chemoter* 2000, 44:3235-36.
- Mutzel W; Speck U. Pharmacokinetics and biotransformation of iothexol in the rat and the dog. *Acta Radiology Supplement*. 1980; 362:87-92.
- Mylonakis ME; Ceron JJ; Leontides L; Siarkou VI; Martinez S; Tvar-ijonaviciut A; Koutinas AF; Harrus S. Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 811-817.
- Nabity MB. Urinary biomarkers of chronic kidney disease in veterinary medicine: where do we stand? *Proceeding of the ACVP/ASVCP*. 2010a.

Nabity MB; Bogges MM; Kashtan CE; Lees GE. Day to day variation of the urine protein:creatinine ratio in female dogs with stable glomerular proteinuria caused by X-linked hereditary nephropathy. *J Vet Intern Med* 2007; 21:425.

Nabity MB; Brock R; Brown JS; Cianciolo R; Hunter C y cols. Comparison of urine sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with renal histologic findings in dogs with renal disease (abstract). *J Vet Intern Med* 2010b; 24:769.

Nabity MB; Lees GE; Boggess MM; Yerramilli M; Obare E; Yerramilli M; Rakitin A; Aguiar J; Relford R. Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *J Vet Intern Med* 2015; 29(4): 1036-1044.

Nabity MB; Lees GE; Dangott LJ; Cianciol R; Suchodolsk JS; Steiner JM. Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. *Vet Clin Pathol* 2011; 40(2):222-232.-430.

Nangaku M; Couser WG. Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury. *Clin Exp Nephrol* 2005; 9:183-191.

National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease. Evaluation, classification, and stratification. Part 4. Definition and classification of stages of chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:S46-S75.

Nelson RW; Couto CG. *Small Animal Internal Medicine*, 4th ed. Edinburgh: Mosby; 2009.

Nieto CG; Navarrete I; Habela MA; Serrano F; Redondo E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 1992; 45: 33-47.

Noli C; Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L.chagasi*). *Vet J* 2014 Dec; 202(3):425-35

Oliva G; Gradoli L; Ciaramella P; De Luna R; Cortese L; Orsisni S; Davidson RN; Persechino A. Activity of liposomal amphotericin B(AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36:1013-1019.

Oliva G; Roura X; Crotti A; Maroli M; Castagnaro M; Gradoni L; Lubas G. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 236 (11): 1192-1198.

Oliveira RA; Lima CG; Mota RMS; Martins AMC; Sanches TR; Seguro AC; Andrade LC; Silva Junior GB; Libório AB; Daher EF. Renal function evaluation in patients with American Cutaneous Leishmaniasis after specific treatment with pentavalent antimonial. *BMC Nephrology* 2012; 13:44.

O'Neill DG; Elliott J; Church DB; McGreevy PD; Thomson PC; Brodbelt DC: Chronic Kidney Disease in Dogs in UK Veterinary Practices: Prevalence, Risk Factors, and Survival. *J Vet Intern Med* 2013; 27:814–821.

Panaro MA; Lisi S; Mitolo V; Acquafredda A; Fasanella A; Carelli MG; Brandonisio O. Evaluation of killing, superoxide anion and nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog monocytes. *Cytobios* 1998; 95, 151-160.

Palacio J; Liste F; Gascon M. Urinary protein/creatinine ratio in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Vet Rec* 1995; 137:576-568.

Palacio J; Liste F; Gascon M. Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis. *Vet Rec* 1997; 3:477:480.

Paltrinieri S; Solano-Gallego L; Fondati A; Lubas G; Gradoni L; Castagnaro M, Crotti A; Maroli M; Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 236(11): 1184-1191.

Paltrinieri S; Ravicini S; Rossi G; Roura X. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. *The Veterinary Journal* 2010b; 1 86: 393-395.

Panaro MA; Brandonisio O; Cianciulli A; Cavallo P; La casella V; Paradies P; Testini G; De Caprariis D; Mitolo V; Otranto D: Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Parasitology* 2009; 136:823-831.

Panciera DL; Lefebvre HP. Effect of Experimental Hypothyroidism on Glomerular Filtration Rate and Plasma Creatinine Concentration in Dogs. *J Vet Intern Med* 2009; 23:1045–1050.

Paradies P; Sasanelli M; Amato ME; Greco B; De Palo P; Lubas G. Monitoring the reverse to normal of clínico-pathological findings and the disease free interval time using four different treatment protocols for the canine leishmaniosis in an endemic area. *Res Vet Sci* 2012; 93: 843-847.

Paradies P; Sasanelli M; de Caprariis; Testini G; Traversa D; Lia RP; Dantas-Torres F; Otranto D. Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary J* 2010; 186: 370-373.

Paris C; Loiseau PM; Bories C; Bréard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 852-859.

Parker VJ; Freeman LM. Association between Body Condition and Survival in Dogs with Acquired Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med* 2011; 25:1306-1311.

Petanides TA; Koutinas AF; Mylonakis ME; Day MJ, Saridomichelakis MN; Leontides LS; Mischke R; Diniz P; Breitschwerdt EB; Kritsepi M; Garipidou VA; Koutinas CK; Lekkas S. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). J Vet Intern Med. 2008; 22(4):866-72.

Pennisi MG; De Majo M; Masucci M; Britti D; Vitale F; Del Maso R. Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. Vet Rec 2005; 156:346-349.

Peña MT; Roura X; Davidson MG. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). Vet Ophthalmol 2000; 3:35-41.

Peters AM. Quantification of renal hemodynamics with radionuclides. Eur J Nucl Med 1991; 18:274-286.

Phillips JK; Boyd R; Krockenberger MB; Burgio G. Progression of anemia and its relationship with renal function, blood pressure, and erythropoietin in rats with chronic kidney disease. Vet Clin Pathol 2015; 44(3):342–354.

Pierantozzi M; Roura X, PhD; Paltrinieri S; Poggi M; Zatelli A. Variation of Proteinuria in Dogs with Leishmaniasis Treated with Meglumine Antimoniate and Allopurinol: A Retrospective Study. J Am Anim Hosp Assoc 2013; 49.

Planellas M; Cuenca R; Tabar MD y cols. Evaluation of C-reactive protein, haptoglobin and cardiac troponin I levels in brachycephalic dogs with upper airway obstructive syndrome. Vet Res. 2012; 8:152– 159.

Poli A; Abramo F; Mancianti F; Nigro M; Pieri S; Bionda A. Renal involvement in canine leishmaniasis: a light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. Nephron 1991, 57: 444-452.

Polzin DJ. Chronic Kidney Disease in Small Animals. Vet Clin Small Anim 2011, 41:15-30.

Polizopoulou ZS; Koutinas CK; Ceron JJ; Tvarijonaviciute A; Martinez-Subiela S; Dasopoulou A; York MJ; Roman IF, Gandhi M; Patel S; O'Brien PJ. Correlation of serum cardiac troponin I and acute phase protein concentrations with clinical staging in dogs with degenerative mitral valve disease. Vet Clin Pathol 2015; 44(3):397-404.

Polzin DJ; Osborne CA; Ross S: Chronic kidney disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat, 6th ed. Stephen J. Ettinger, Edward C. Feldman, eds. St. Louis, MO; Oxford: Elsevier Saunders; 2005:1756–1785.

- Porter P. Comparative study of the macromolecular components excreted in the urine of dogs and man. *J Comp Pathol Therap* 1964; 74:108-118.
- Plevraki K; Koutinas AF; Kaldrymidou H; Roumpies N; Papazoglou LG; Saridomichelakis MN; Savvas I; Leondides L. Effects of Allopurinol Treatment on the Progression of Chronic Nephritis in Canine Leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 2006; 20:228–233.
- Prajczek S; Heidenreich U; Pfaller W; Kotanko P; Lhotka K y cols. Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25:1896-1903.
- Prober LG; Johnson CA; Olivier NB; Thomas JS. Effects of semen in urine specimens on urine protein concentration determined by means of distick analysis. *Am J Vet Res* 2010; 71(3):288-292.
- Raila J; Forterre S; Kohn; Brunnberg L; Schweigert FJ. Effects of chronic renal disease on the transport of vitamin A in plasma and urine of dogs. *Am J Vet Res* 2003; 64:874-879.
- Raila J; Forterre S; Schweigert F J. Physiologic and pathophysiologic fundamentals of proteinuria—a review. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 2005; 118: 229–239.
- Raila J; Schweigert FJ; Kohn B. C-reactive protein concentrations in serum of dogs with naturally occurring renal disease. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23(4):710-715.
- Raldolph JF; Sacarlett J; Stokol T; MacLeod JN. Clinical efficacy and safety of recombinant canine erythropoietin in dogs with anemia of chronic renal failure and dogs with recombinant human erythropoietin-induced red cell aplasia. *J Vet Intern Med* 2004; 18:81-91.
- Rallis T; Day MJ; Saridomichelakis MN; Adamama-Moraitou KK; Papazoglou L; Fytianou A; Koutinas AF. Chronic hepatitis associated with canine Leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J Comp Pathol* 2005; 132:145-152.
- Real L; Loret A. *Medicina Felina. AVEPA formación continuada* 2011.
- Reis AB; Martins-Filho O; Teixeira-Carvalho A; Carvalho MG; Mayrink W; Franca-Silva JC; Giunchetti RC; Genaro O; Correa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 2006 a; 81:68-75.
- Reis AB; Teixeira-Carvalho A; Vale AM; Marques MJ; Giunchetti RC; Mayrink W; Guerra LL; Andrade RA; Correa-Oliveira R; Martins-Filho OA. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006b; 112: 102-116.

- Reithinger R; Quinnell RJ; Alexander B; Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 2002, 2352-2356.
- Rhalen A; Sahibi H; Lasri S; Jaffe CL. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 71:69-76.
- Ribeiro RR; Moura EP; Pimentel VM; Sampaio WM; Silva SM; Schettinin DA; Alves CF; Melo FA; Tafuri WL; Demicheli C; Melo MN; Frézard F; Michalick MS. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* following treatment with liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2564-2572.
- Rifai N; Gillette MA; Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nature Biotechnology* 2006, 24: 971-983.
- Rivers BJ; Walter PA; O'Brien TD y cols. Evaluation of urine gammaglutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio as a diagnostic tool in an experimental model of aminoglycoside-induced acute renal failure in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1996; 32:323–336.
- Rodriguez-Cortés A; Ojeda A; Todoli A; Alberola J. Performance of commercially available serological diagnostic test to detect *leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Vet Parasitol* 2013; 191:363-366.
- Ross LA. Hypertension and chronic renal failure. *Semin Vet Med Surg (Small Animals)* 1992; 7:221-226.
- Rossi G; Ibba F; Meazzi S; Giordano A; Paltrinieri S. Paraoxonase activity as a tool for clinical monitoring of dogs treated for canine leishmaniasis. *Vet J* 2014; 199: 143-149.
- Roudebush P; Polzin DJ; Adams LG; Towell TL; Forrester SD. An evidence-based review of therapies for canine chronic kidney disease. *J Small Anim Pract* 2010, 51: 244–252.
- Rougier S; Vouldoukis I; Fournel S; Pérès S; Whoehrlé. Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: a pilot study. *Vet Parasitol* 2008; 153: 244-254.
- Roura X; Fondevila D; Sánchez A; Ferrer L. Detection of *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11:385-387.
- Sabaté D; Llinás J; Homedes J; Sust M; Ferrer L. A single center, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment

programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Prev Vet Med* 2014; 115: 56-63.

Santa-Rita RM; Santos Barbosa H; Meirelles MN; Castro SL. Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2000; 75: 219-228.

Salgado Filho N; Ferreira TM; Costa JM. Involvement of the renal function in patients with visceral leishmaniasis (kala-azar). *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 217-221.

Sampaio RN; Paula CD; Sampaio JH y cols. The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of pentavalent antimony administered in a dose of 40 mg Sb V/kg/day, 12/12 hr, for 30 days in the mucocutaneous form of leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30: 457-467.

Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol* 2009; 20:471-489.

Saridomichelakis MN; Mylonakis ME; Leontides LS; Koutinas AF; Billinis C; Kontos VI. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of the canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73:82-86.

Sasaki A; Sasaki Y; Iwama R; Shimamura S; Yabe K; Takasuna K; Ichijo T; Furuhashi K; Satoh H. Comparison of Renal Biomarkers with Glomerular Filtration Rate in Susceptibility to the Detection of Gentamicin-Induced Acute Kidney Injury in Dogs. *J Comp Path* 2014; 151: 264-270.

Sayari M; Avizeh R; Barati F. Microscopic evaluation of renal changes in experimental canine visceral leishmaniosis after chemoand immunotherapy. *Pak J Biol Sci* 2008, 11:1630-1633.

Schalling HD; Cardoso L; Hommmers M; Kroon N; Belling G; Rodrigues M; Semiao-Santos DJ; Vetter H. Development of a dipstick assay for detection of *Leishmania*-specific canine antibodies. *J Clin Microbiol* 2004; 42:193-197.

Schalling HD; Cardoso L; Semiao-Santos SJ. Seroepidemiology of canine leishmaniosis in Evora (southern Portugal): 20 year trends. *Parasit Vectors* 2013; 6:100.

Schenck PA; Chew DJ; Nagode LA; Rosol TJ. Disorders of calcium: hypercalcemia and hypocalcemia. En: DiBartola SP, ed. *Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice*. 3rd ed. St. Louis: WB Saunders; 2006:122-194.

Schultze AE; Jensen RK. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Canine Urinary Proteins for the Analysis and Differentiation of Tubular and Glomerular Diseases. *Vet Clin Pathol* 1989; 18(4):93-97.

- Scott RC. Immune-mediated renal disease, in: Kirk R.W., Bonagura J.D. (Eds.), *Current Veterinary Therapy VIII*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1983, pp. 968-975.
- Segev G; Bandt C; Francey T; Cowgill LD. Aluminium toxicity following administration of aluminum-based phosphate binders in 2 dogs with renal failure. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 1432-1435.
- Segev G; Palm C; LeRoy B; Cowgill LD; Westrop JL. Evaluation of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Marker of Kidney Injury in Dogs. *J Vet Intern Med* 2013; 27:1362–1367.
- Sharp CR; Kerl ME; Mann FA. A comparison of total calcium, corrected calcium, and ionized calcium concentrations as indicators of calcium homeostasis among hypoalbuminemic dogs requiring intensive care. *J Vet Emerg Crit Care* 2009; 19(6):571-8
- Shaw S; Langton DA; Hillman TJ. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? *Vet Parasitol* 2009; 163: 281-285.
- Singh OP; Sundar S. Analysis of total urine proteins: Towards a non-invasive approach for diagnosis of visceral leishmaniosis. *J Mol Biomark Diagn* 2012; 27(3):131.
- Silvestrini P; Zoia A; Planellas M; Roura X; Pastor J y cols. Iron status and C-reactive protein in canine leishmaniosis. *J Small Anim Pract* 2014; 55: 95-101.
- Simões e Silva AC; Silveira K D; Ferreira AJ; Teixeira MM: ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol* 2013; 169: 477-492.
- Slappendel RJ. Canine Leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q* 1988 Jan; 10(1):1-16.
- Solano-Gallego L; Koutinas A; Miró G; Cardoso L; Pennisi MG; Ferrer L; Bourdeau P; Oliva G; Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2009; 165:1-18.
- Solano-Gallego L; Miró G; Koutinas A; Cardoso L; Pennisi MG; Ferrer L; Bourdeau P; Oliva G; Baneth G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors* 2011; 4:86.
- Solano-Gallego L; Riera C; Roura X; Gallego M; Valladeres JE; Fisa R; Castillejo S; Alberala J; Ferrer L; Arboix M; Portus M: Leishmania infantum specific IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas: evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol* 2001; 96:265-276.

- Soyoral YU; Aslan M; Emre H; Begenik H; Erdur FM; Turkel A y cols Serum paraoxonase activity and oxidative stress in patients with adult nephrotic syndrome. *Atherosclerosis* 2011; 218(1):243–6.
- Steinbach S; Krolop N; Strommer S; Herrera-Pérez Z; Geraci S; Friedemann J; Gretz N; Neiger R. A Pilot Study to Assess the Feasibility of Transcutaneous Glomerular Filtration Rate Measurement Using Fluorescence-Labelled Sinistrin in Dogs and Cats. *PLOS ONE* 2014; 25: 1-10.
- Steinbach S; Weis J; Schweighauser A; Francey T; Neiger R. Plasma and Urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Dogs with Acute Kidney Injury or Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med* 2014; 28:264–269.
- Stenvinkel P: Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated? *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(S8):33–8.
- Straus-Ayali D; Jaffe CL; Burshtain O; Gronen L; Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis* 2004; 189(9): 1729:33.
- Sundar S. Treatment of visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2001;190:89-92.
- Syme H. Hypertension in small animal kidney disease. *Vet Clin Small Anim* 2011; 41:63-89.
- Tassi P; Ormas P; Madonna M; Carli S; Belloli C; De Natale G; Ceci L; Marcotrigiano GO. Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res Vet Sci* 1994;56:144-50.
- Tecles F; Caldín M; Zanella A; Membiela F; Tvarijonaviciute A y cols. Serum acute phase protein concentration in female dogs with mammary tumors. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21: 214-219.
- Tilg H; Ulmer H; Kaser A; Weiss G. Role of IL-10 for induction of anemia during inflammation. *J Immunol* 2002; 169: 2204-2209
- Torrente C; Manzanilla EG; Bosch L; Fresno L; Rivera del Alamo M; Andaluz A; Saco Y; Ruiz de Gopegui R. Plasma iron, C-reactive protein, albumin, and plasma fibrinogen concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *J Vet Emerg Crit Care* 2015; 25(5): 611-619.
- Torres M; Bardagi M; Roura X; Zanna G; Ravera I; Ferrer L. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treatment with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 2011; 188: 346-351.

Tosa N; Morimatsu M; Nakagawa M y cols: Purification and identification of a serum protein increased by anthelmintic drugs for *Dirofilaria immitis* in dogs. *J Vet Med Sci* 1993; 55:27–31.

Tozzi Brada E; Artero de Carvalho Leite JH; Azadinho Rosa F; Tivelli P; Mariano Araújo A; Martins de Almeida BF; Ferrari HF; Ciarlini PC; Fabrino MG; Marcondes M. Hypertension and its correlation with renal lesions in dogs with leishmaniasis. *Braz J Vet Parasitol* 2015; 24(1): 45-51.

Türkeş C; Söyüt H; Beydemir S. Effect of calcium channel blockers on paraoxonase-1 (PON1) activity and oxidative stress. *Pharmacol Rep.* 2014; 66(1):74-80.

Tvarijonaviciute A; Caldin M; Martinez-Subiela S; Tecles F; Pastor J; Ceron JJ. Serum paraoxonase 1 and butyrylcholinesterase in dogs with hyperadrenocorticism. *Vet J* 2015; 203:262-263.

Tvarijonaviciute A; Ceron JJ; Martinez-Subiela S; García-Martínez JD. Serum and urinary adiponectin in dogs with renal disease from leishmaniasis. *Vet Rec* 2012; 171 (12): 297.

Tvarijonaviciute A; García Martínez JD; Caldin M; Martinez-Subiela S; Tecles F; Pastor J; Ceron JJ. Serum paraoxonase 1 (PON1) activity in acute pancreatitis of dogs. *J Small Anim Pract* 2015; 56:67-71.

Tvarijonaviciute A; Kocaturk M; Cansev M; Tecles F; Ceron JJ; Yil-maz Z. Serum butyrylcholinesterase and paraoxonase 1 in a canine model of endotoxemia: effects of choline administration. *Res Vet Sci* 2012b; 93(2):668–74.

Tvarijonaviciute A; Tecles F; Caldin M; Tasca S; Cerón JJ. Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 measurement in dogs. *Am. J. Vet. Res* 2012c; 73: 34-41.

Uhrikova I; Rauserova-Lexmaulova L; Rehakova K; Scheer P; Doube J. C-reactive protein and high mobility group box 1 in dogs with gastric dilatation and volvulus. *J Vet Emerg Crit Care* 2015; 25(4):488-494.

Valladares JE; Alberola J; Esteban M; Arborix M. Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Vet Rec* 1996; 138:181-183.

Vanarsa K; Ye Y; Han J, Xie C, Mohan C; Wu T. Inflammation associated anemia and ferritin as disease markers in SLE. *Arthritis Res Ther* 2012; 14:R182.

Veiga JP; Khanan R; Rosa TT y cols. Pentavalent antimonial nephrotoxicity in the rat. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1990; 32: 304–309.

Vieyra MB; Heeger PS. Novel aspects of complement in kidney injury. *Kidney Int* 2010; 77, 495-499.

Von Eynatten M; Liu D; Hock C; Oikonomou D; Baumann M; Allolio B; Korosoglou G; Morcos M; Campean V; Amann K; Lutz J; Heemann U; Nawroth PP; Bierhaus A; Humpert P M. Urinary adiponectin excretion: a novel marker for vascular damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 2009; 58, 2093–2099

Von Hendy-Willson VE; Pressler BM. An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. *Vet J* 2011; 188(2): 156-165.

Vouldoukis I; Rougier S; Dugas B; Pino P; Mazier D; Woehrlé F. Canine Visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol* 2006; 135: 137-146.

Waki MF; Kogika MM; Martorelli CR; Caragelasco DS; Saraiva FH; Hagen SCF; Fonseca Pinto ACF. Sequential study of urinary proteins by sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and albumin-to creatinine ratio in dogs with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2013; 27 (3):733-733.

Waldrop JE. Urinary electrolytes, solutes and osmolality. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008; 38(3):503-512.

Watson AD; Berliner JA; Hama SY; La Du BN; Faull KF; Fogelman AM; Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96: 2882-2891.

Watson ADJ; Lefebvre HP; Concordet D, Laroute V, Ferre JP, Braun JP, Conchou F, Toutain PL. Plasma Exogenous Creatinine Clearance Test in Dogs: Comparison with Other Methods and Proposed Limited Sampling Strategy. *J Vet Intern Med* 2002; 16:22–33.

Wehner A; Hartmann K; Hirschberger J. Utility of serum cystatin C as a clinical measure of renal function in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2008a; 44:131-138.

Wehner A; Hartmann K; Hirschberger J. Association between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non. renal disease. *Ver Rec* 2008b:162:141-147.

Weiss G; Goodnough LT: Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1011-1023.

Whittemore JC; Gill VL; Jensen WA; Radecki SV; Lappin MR. Evaluation of the association between microalbuminuria and systemic disease in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 229:958-963.

Whittemore JC; Marcum BA; Mawby DI; Coleman MV; Hacket TB; Lappin MR. Associations among Albuminuria, C-Reactive Protein Concentrations, Survival Predictor Index Scores, and Survival 78 Critically Ill Dogs. *J Vet Intern Med* 2011;25:818-824.

- Whittemore JC; Miyoshi Z; Jensen WA; Radecki SV; Lappin MR. Association of microalbuminuria and the urine albumin-to-creatinine ratio with systemic disease in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 230: 1165-1169.
- Woerly V; Maynard L; Sanquer A; Eun HM. Clinical efficacy and tolerance of miltefosin in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol Res* 2009; 105:463-469.
- Xenoulis PG; Saridomichelakis MN; Chatzis MK; Kasabalis D; Petanides T; Suchodolski JS; Steiner JM. Prospective evaluation of serum pancreatic lipase immunoreactivity and troponin I concentration in *Leishmania infantum*-infected dogs treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol* 2014; 203: 326-330.
- Yabuki A; Mitani S; Fujiki M; Misumi K; Endo Y; Miyoshi N y cols. Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of myofibroblasts. *Res Vet Sci* 2010, 88(2): 294-299.
- Yalçın A; Çetin M. Electrophoretic Separation of Urine Proteins of Healthy Dogs and Dogs with Nephropathy and Detection of Some Urine Proteins of Dogs Using Immunoblotting. *Revue Méd Vét* 2004; 155 (2):104-112.
- Yuan B; Klein MH; Contiguglia RS y cols. The role of aluminum in the pathogenesis of anemia in an outpatient hemodialysis population. *Renal Fail* 1989; 11:91–96.
- Zaragoza C; Barrera R; Centeno F; Tapia JA; Durán E; González M; Mañé MC. SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Res* 2003; 34:137–151.
- Zaragoza C; Barrera R; Centeno F; Tapia JA; Mañé MC. Characterization of Renal Damage in Canine Leptospirosis by Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS–PAGE) and Western Blotting of the Urinary Proteins. *J. Comp Path* 2003; 129: 169-178.
- Zaragoza C; Barrera R; Centeno F; Tapia JA; Mañé MC. Canine pyometra: a study of the urinary proteins by SDS–PAGE and Western blot. *Theriogenology* 2004; 61:1259-1272.
- Zatelli A; Borgarelli M; Santilli B; Bonfanti U; Nigrisoli E; Zanatta R; Tarducci A; Guarraci A. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am J Vet Res* 2003; 64:558-61.
- Zatelli A; Paltrinieri S; Nizi F; Roura X; Zini E. Evaluation of a urine distick test for confirmation or exclusion of proteinuria in dogs. *Am J Vet Res* 2010; 71: 235-240.
- Zimmerman D; Burns KD: Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. *Clin Sci* 2012;123: 333-346.

Zini E; Bonfanti U; Zatelli A. Evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. Am J Vet Res 2004; 65 (7):964-971.

11.- ANEXOS

Tabla I: Signos clínicos de los pacientes del Grupo G en los tres tiempos (D0, D30 y D90)

	G1 D0	G1 D30	G1 D90	G2 D0	G2 D30	G2 D90	G3 D0	G3 D30	G3 D90	G4 D0	G4 D30	G4 D90	G5 D0	G5 D30	G5 D90	G6 D0	G6 D30	G6 D90
Apetito	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Astenia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	0
Temperatura	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Condición corporal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
PU/PD	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Atrofia muscular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Linfadenomegalia	1	1	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	1	1
Manifestaciones oculares	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Palidez de mucosas	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2
Epistaxis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0
Vómitos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Diarreas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cojera/dolor articular	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0
Manifestaciones cutáneas: Forma ulcerativa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0
Dermatitis exfoliativa	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
Hiperqueratosis generalizada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2	0	0
Total	7	4	0	8	0	0	6	2	2	12	13	3	2	0	0	10	17	3

Tabla II: Signos clínicos de los pacientes del Grupo G en los tres tiempos (D0, D30 y D90)

	G7 D0	G7 D30	G7 D90	G8 D0	G8 D30	G8 D90	G9 D0	G9 D30	G9 D90	G10 D0	G10 D30	G10 D90	G11 D0	G11 D30	G11 D90	G12 D0	G12 D30	G12 D90
Apetito	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Astenia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Temperatura	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Condición corporal	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
PU/PD	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atrofia muscular	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	1	0
Linfadenomegalia	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	0	0
Manifestaciones oculares	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	2	0	2	0	0	0	0
Palidez de mucosas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0
Epistaxis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Vómitos	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diarreas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cojera/dolor articular	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
Manifestaciones cutáneas: Forma ulcerativa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
Dermatitis exfoliativa	2	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	1	0	0	0
Hiperqueratosis generalizada	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Total	9	3	3	12	2	1	2	0	0	6	2	2	14	10	3	10	4	3

Tabla III: Signos clínicos de los pacientes del Grupo M en los tres tiempos (D0, D30 y D90)

	M1 D0	M1 D30	M1 D90	M2 D0	M2 D30	M2 D90	M3 D0	M3 D30	M3 D90	M4 D0	M4 D30	M4 D90
Apetito	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Astenia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Temperatura	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Condición corporal	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
PU/PD	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0
Atrofia muscular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfadenomegalia	0	0	0	0	0	0	3	1	0	3	3	0
Manifestaciones oculares	0	0	0	2	2	2	2	2	2	0	0	0
Palidez de mucosas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Epistaxis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vómitos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diarreas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cojera/dolor articular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Manifestaciones cutáneas: Forma ulcerativa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dermatitis exfoliativa	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
Hiperqueratosis generalizada	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	5	2	2	12	3	2	8	8	0

Tabla IV: Signos clínicos de los pacientes del Grupo M en los tres tiempos (D0, D30 y D90)

	M5 D0	M5 D30	M5 D90	M6 D0	M6 D30	M6 D90	M7 D0	M7 D30	M7 D90	M8 D0	M8 D30	M8 D90
Apetito	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Astenia	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Temperatura	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Condición corporal	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
PU/PD	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0
Atrofia muscular	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfadenomegalia	3	0	0	1	0	0	0	0	0	3	1	0
Manifestaciones oculares	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Palidez de mucosas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
Epistaxis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Vómitos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diarreas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Cojera/dolor articular	0	0	0	3	0	0	3	3	3	0	0	1
Manifestaciones cutáneas: Forma ulcerativa	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Dermatitis exfoliativa	2	1	0	1	0	0	0	0	0	2	1	1
Hiperqueratosis generalizada	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0
Total	14	3	0	12	3	3	7	3	3	17	4	6

Tabla V: Peso (kg) de los pacientes de los dos grupos en los tres tiempos (D0, D30 y D90)

Paciente	P D0	P D30	P D90
G1	13,1	13,6	14,4
G2	24	27	27,8
G3	10,4	11,3	27,8
G4	20,8	23,5	12,5
G5	26,5	28	23,3
G6	34,6	34,5	30,6
G7	32,8	36,6	40,1
G8	17,1	19	37
G9	12,5	16	20,4
G10	16,7	17	13,2
G11	16	17,4	18
G12	33,8	11,2	11,5
M1	11,3	9,9	11,5
M2	9	Sd	46
M3	45	44,5	37
M4	33,5	35	28
M5	26,7	28,1	26,7
M6	24	24,2	5,2
M7	5	4,9	28,6
M8	29,6	29,8	41,5

Tabla VI: Resultados de la inmunofluorescencia indirecta y del proteinograma

Paciente	IFI D0	IFI D90	Alb g/d D0	Alb g/dl D30	Alb g/dl D90	GlobT g/dl D0	GlobT g/dl D30	GlobT g/dl D90	A/G D0	A/G D30	A/G D90	PT g/dl D0	PT g/dl D30	PT g/dl D90
G1	1/800	1/50	2,56	3,11	3,98	3,43	3,7	2,8	0,75	0,84	1,41	6	6,8	6,8
G2	1/1600	1/200	2,21	3,33	3,57	5,8	3,68	3,24	0,38	0,91	1,1	8	7	6,8
G3	1/1600	1/400	1,33	2,46	4,64	4,67	6,14	3,76	0,28	0,4	1,24	6	8,6	8,4
G4	1/800	1/1600	2,49	2,7	2,55	5,7	4,1	4,15	0,44	0,66	0,61	8,2	6,8	6,7
G5	1/400	1/400	2,72	2,04	2,7	3,38	3,47	3,49	0,8	0,59	0,77	6,1	5,5	6,2
G6	1/800	1/100	1,65	1,7	2,65	5,5	3,5	4,34	0,3	0,49	0,61	7,2	5,2	7
G7	1/1600	1/50	2,34	3,35	4,07	6,57	2,64	2,53	0,4	1,27	1,61	8,8	6	6,6
G8	1/1600	1/1600	3,35	3,34	4,03	4,94	4,26	3,75	0,68	0,78	1,07	8,3	7,6	7,8
G9	1/6400	1/400	1,72	3,35	3,98	9,68	4,15	2,82	0,18	0,81	1,41	11,4	7,5	6,8
G10	1/6400	1/800	3,44	3,56	3,93	6,05	3,84	3,27	0,57	0,92	1,2	9,5	7,4	7,2
G11	1/6400	1/400	1,19	1,45	1,61	10,2	8,44	8,19	0,12	0,15	0,2	11,4	10,9	9,8
G12	1/3200	1/6400	1,96	2,69	2,8	6,55	5,51	5,8	0,31	0,49	0,48	8,6	8,2	8,6
M1	1/400	0	3,08	3,17	3,2	2,72	9,44	2,9	1,14	1,3	1,1	5,8	5,6	6,1
M2	1/6400	1/3200	2,76	2,92	2,01	7,84	3,89	5,49	0,35	0,75	0,37	10,6	6,8	7,5
M3	1/800	1/800	2,18	1,98	1,83	4,62	3,53	4,07	0,47	0,56	0,45	6,8	5,5	5,9
M4	1/200	1/50	1,9	2,86	2,72	5,9	4,13	4,48	0,32	0,69	0,61	7,8	7	7,2
M5	1/6400	1/1600	1,77	2,14	3,1	8,23	6,86	4,09	0,22	0,31	0,76	10	9	7,2
M6	1/1600	1/1600	2,37	2,76	3,83	5,43	4,34	4,74	0,44	0,63	0,87	7,8	7,1	8,2
M7	1/800	1/1600	2,22	1,89	1,94	4,74	5,21	5,47	0,4	0,36	0,36	7,7	7,1	7,4
M8	1/1600	1/1600	1,72	2,59	2,78	4,79	5,01	5,85	0,36	0,52	0,47	6,5	7,6	8,6

Tabla VII: Parámetros hematológicos

Paciente	Htc % D0	Htc % D90	GB 10 ³ /μL D0	GB 10 ³ /μL D90	Plaquetas 10 ³ /μL D0	Plaquetas 10 ³ /μL D90
G1	30,5	44,8	3,7	9,1	267	444
G2	40	54,7	8,63	5,4	234	217
G3	45,2	49	11,8	16,2	101	Sd
G4	30	42,3	11,5	9,6	364	Sd
G5	47,9	49,06	4,6	6,06	Sd	341
G6	38,8	34,9	12,4	8,4	Sd	202
G7	54	58,8	10	10,3	196	198
G8	43,3	48,4	5,9	10,1	255	443
G9	32,4	52,3	10,7	9	202	348
G10	45,4	52,3	9,9	7,7	334	349
G11	38,9	37,4	15,26	18,7	451	235
G12	28,5	38,4	7,3	8,7	314	360
M1	48,7	43	10,6	8,5	252	284
M2	29,2	31,3	12,1	8,4	385	Sd
M3	53,1	41,6	6,13	6,2	213	221
M4	49,7	52,1	11	10,2	393	475
M5	33	38,1	15,2	8,1	319	271
M6	35,5	33,9	11,3	10,2	345	317
M7	31,2	28,7	4,9	5,4	206	172
M8	37	26	10,5	5,6	225	38

Tabla VIII: Perfil bioquímico

Paciente	ALT UI/L D0	ALT UI/L D90	UREA mg/dl D0	UREA mg/dl D90	CaT mg/dl D0	CaT mg/dl D90	Pinorg mg/dl D0	Pinorg mg/dl D90
G1	11	21	38	24	9	9,2	4,6	3,7
G2	48	20	25,6	20	8,8	8,7	4,4	4,3
G3	10	101	20	20	8,5	9,3	4	4,1
G4	20	644	25	18	10,1	9,9	8,2	4,7
G5	93	397	21	17	9,5	9,8	8,6	4,3
G6	10	10	116	47	8,5	9,1	4,2	4,3
G7	46	32	60,52	35	8,9	9,3	5,3	5,1
G8	17	23	35	20	9,6	9,4	3,8	2,6
G9	23	26	19	29	9,9	9,8	4,4	4,3
G10	9	13	41	35	9,5	9,6	4,2	4
G11	36	34	118	130	8,5	7,9	10,8	4
G12	24	32	89	64	9,1	10	4,1	3,8
M1	24	44	34	23	9,7	9,3	4,3	4,3
M2	27	14	50	33	9,1	9	6,3	3,7
M3	70	17	65	120	8,9	8,8	4,6	4,6
M4	19	Sd	63	71	9,2	9,8	4,1	4
M5	18	19	23	38	9	9,5	4,2	3,4
M6	11	17	26	21	9,4	9,9	4,2	3,5
M7	19	18	49	38	8,4	8,2	5	5,4
M8	38	38	78	105	10	9,4	4,2	5,8

Tabla IX: Parámetros de funcionalidad renal

Paciente	TFG ml/kg/min D0	TFG ml/kg/min D90	Cr mg/dl D0	Cr mg/dl D30	Cr mg/dl D90	UPC D0	UPC D30	UPC D90	DU D0	DU D30	DU D90
G1	3,8	3,4	0,6	0,8	0,6	0,16	0,09	0,1	1.025	1.015	1.028
G2	3,5	3,4	0,7	0,9	0,76	0,14	0,1	0,12	1.025	1.020	1.035
G3	4,9	4,3	0,55	0,5	0,6	0,83	0,8	1	1.039	1.022	1.018
G4	8,7	3,5	0,52	0,5	0,5	0,96	0,32	0,3	1.040	1.040	1.038
G5	2,9	2,7	1,2	1,2	0,7	0,09	0,07	0,07	1.016	1.024	1.030
G6	4,1	9,4	0,6	0,8	0,8	4,6	7,46	2,7	1.025	1.019	1.032
G7	3,4	3,4	0,7	0,9	0,9	1,28	0,6	0,08	1.019	1.024	1.041
G8	3,3	3	0,7	0,6	0,72	0,3	0,13	0,25	1.049	1.035	1.027
G9	5,1	4,2	0,6	0,9	0,91	0,17	0,08	0,1	1.016	1.020	1.038
G10	3,6	2,9	0,9	1,1	1,1	0,21	0,07	0,07	1.047	1.016	1.033
G11	2,1	1,7	1,36	1,7	1,59	6	3,9	4,7	1.017	1.025	1.017
G12	1,5	1,5	1,66	2,4	1,82	1,6	0,65	1,26	1.022	1.016	1.015
M1	5	4	0,7	0,6	0,77	0,13	0,1	0,12	1.037	1.025	1.031
M2	2,8	3,1	0,6	0,6	0,9	6,4	1,7	1,62	1.033	1.043	1.024
M3	1,8	1,6	1,3	1,2	1,9	2,9	1,42	0,4	1.009	1.030	1.029
M4	1,5	1,4	1,5	1,6	1,87	1,65	2,8	2,73	1.028	1.015	1.020
M5	3,9	2,7	1	1,1	1,8	0,4	0,21	0,09	1.035	1.010	1.027
M6	2,3	2,1	0,9	1	1	4	1,5	0,52	1.006	1.016	1.021
M7	3,2	3,2	0,5	0,6	0,6	8,4	8,48	8	1.022	1.010	1.010
M8	2,5	Sd	1,85	1,9	2,8	2,6	2,2	2,9	1.038	1.032	1.024

Tabla X: Electroforesis de proteína en orina SDS-PAGE

Paciente	% D.O.PAPM D0	% D.O.PAPM D30	% D.O.PAPM D90	% D.O.PBPM D0	% D.O.PBPM D30	% D.O.PBPM D90
G1	62,6	91,4	84,5	37,4	8,6	15,5
G2	82,3	86,8	72,6	17,17	13,2	27,4
G3	75,4	80,4	82	24,6	19,6	18
G4	64,3	85,2	77,9	35,7	14,8	22,1
G5	99	77,6	43,8	1	22,4	56,2
G6	66,8	73,4	79,2	33,2	26,6	20,8
G7	75,8	96,3	85,2	24,2	3,7	14,8
G8	82,4	88,2	87,9	17,6	11,8	12,1
G9	65,9	95,8	Sd	34,1	4,2	Sd
G10	22,3	90,8	48,2	77,7	9,2	51,8
G11	53	66,3	53	47	33,7	47
G12	Sd	Sd	Sd	Sd	Sd	Sd
M1	52,4	42,5	49,9	47,6	57,5	50,1
M2	59,4	82,7	74	40,6	17,3	26
M3	83,1	71,7	86,5	16,9	28,3	13,5
M4	76,8	77	81	23,2	23	19
M5	59,2	81,7	89,3	40,8	18,3	10,7
M6	67,4	71,9	75,5	32,6	28,1	24,5
M7	53,3	66,7	68,1	46,7	33,3	31,9
M8	Sd	Sd	Sd	Sd	Sd	Sd

Tabla XI: Proteínas inflamatorias de fase aguda

Paciente	Prot.CP µg/ml D0	Prot.CP µg/ml D30	Prot.CP µg/ml D90	Hp g/L. D0	Hp g/L. D30	Hp g/L. D90	FS µg/L D0	FS µg/L D30	FS µg/L D90	PON-1 UI/ml D0	PON-1 UI/ml D30	PON-1 UI/ml D90
G1	5	5	5	4,54	4,78	3,61	748	275,4	241,8	3,07	3,86	4,22
G2	5	5	5	4,4	3,67	3,41	845,1	264,3	236	3,62	4,34	4,9
G3	71	5	5	3,68	4,75	5,35	668,1	254,3	173,4	4	5,04	5,91
G4	54,7	9,9	14,7	3,82	4,69	4,18	903,1	317	347,5	2,93	4,21	4,08
G5	5	Sd	5	2,96		1,61	258,5		291,5	3,29	Sd	3,45
G6	97,1	16,7	24	5,41	5,53	4,19	907	341,9	278,5	2,77	3,48	3,41
G7	56,3	5	5	4,77	3,75	3,17	300,2	201	176,4	3,61	4,97	5,47
G8	7,3	5	5	4,01	3,67	3,85	842	172,6	178	3,94	4,68	4,8
G9	33,7	5	5	0,92	2,56	2,27	883,5	256,4	208	2,19	3,76	4,15
G10	5	5	5	4,12	3,2	4,02	868,6	256,8	206,8	3,79	5,81	5,53
G11	17,6	5	5	1,96	0,65	0,1	784,8	545,1	347,5	2,87	3,03	3,32
G12	86,3	Sd	5	5,02	Sd	5,69	892,1	Sd	232,2	1,95	Sd	4,43
M1	28,5	7,1	5	4,77	4,74	3,43	94,3	83,1	93,9	4,67	4,24	4,36
M2	5	5	9,1	4,53	5,71	4,36	784,8	384,7	404,6	4,41	4,3	3,55
M3	5	5	5	3,08	2,67	2,65	193	379,2	307,7	3,85	3,3	3,23
M4	9,8	5	5	3,8	4,2	3,56	185,9	205,5	200,1	4,03	3,88	4,74
M5	44,9	0,8	2,2	2,24	0,85	0,9	874,9	646,2	254,7	2,1	2,73	4,78
M6	9,9	5	0,2	4,24	2,82	2,87	822,4	693,9	345	3,64	4,03	4,78
M7	36,6	31,2	29,6	3,84	3,9	3,32	883,5	881,9	890,5	2,4	2,2	2,39
M8	18,3	43,6	92,7	5,42	5,15	5,41	708	442,5	865,5	4,1	4,24	3,55

Tabla XII: Correlaciones encontradas en la primera visita (D0). Test de Spearman, significativo $p < 0,05$; correlaciones +: sombreado gris, correlaciones -: marco negro.

	TFG 0	Htc 0	GB 0	Urea 0	ALT 0	Alb 0	GlobT 0	A/G 0	PT 0	FS 0	UPC 0	%D.O. PAPM 0
PC 0											r 0,6014 p 0,0088	
IFI 0							r 0,7496 p 0,0011	r -0,5347 p 0,0198	r 0,7814 p 0,0007			
PAS 0							r -0,5428 p 0,0213		r -0,6583 p 0,0052			
Cr 0	r -0,7066 p 0,0021											
Urea 0	r -0,6130 p 0,0075											
Pinorg 0					r 0,5617 p 0,0143							
Alb 0			r -0,4949 p 0,0310									
GlobT 0			r 0,5444 p 0,0177									
A/G 0			r -0,6780 p 0,0031			r 0,8438 p 0,0002	r -0,7043 p 0,0021					
PT 0							r 0,9402 p 0,0000	r -0,5096 p 0,0263				
Prot.CR 0						r -0,5191 p 0,0237		r -0,5018 p 0,0287			r 0,4595 p 0,0452	
FS 0		r -0,6877 p 0,0027							r 0,4618 p 0,0441			
PON-1 0		r 0,4737 p 0,0389								r -0,7013 p 0,0022		
UPC 0				r 0,6586 p 0,0041		r -0,5694 p 0,0131						
%D.O.PBPM 0												r -0,9979 p 0,0000

Tabla XIII: Correlaciones encontradas en el Grupo G en la segunda visita (D30). Test de Spearman, significativo $p < 0,05$; correlaciones +: sombreado gris, correlaciones -: marco negro.

	PC30	Alb30	GlobT 30	A/G 30	PT30	FS30	UPC 30	% D.O.PAPM	% D.O.PBPM
PC30		r -0,6120 p 0,0344					r 0,7929 p 0,0036		
A/G30		r 0,8351 p 0,0007	r -0,8094 p 0,0014						
PT30			r 0,9261 p 0,0000						
Prot.CR	r 0,8532 p 0,0017						r 0,7845 p 0,0072		
Hp 30					r -0,7685 p 0,0094				
FS30		r -0,8230 p 0,0034	r 0,7475 p 0,0129	r -0,7583 p 0,0110			r -0,8181 p 0,0038	r 0,8181 p 0,0038	
PON-1		r 0,6607 p 0,0376				r -0,6870 p 0,0282			
UPC30		r -0,7269 p 0,0113							
% D.O.PAPM		r 0,9405 p 0,0000	r -0,6517 p 0,0298	r 0,8933 p 0,0002			r -0,6804 p 0,0212		
% D.O.PBPM		r -0,9405 p 0,0000	r 0,6517 p 0,0298	r 0,8933 p 0,0002			r 0,6804 p 0,0212	r -1 p 0,0000	

Tabla XIV: Correlaciones encontradas en el Grupo M en la segunda visita (D30). Test de Spearman, significativo $p < 0,05$; correlaciones +: sombreado gris, correlaciones -: marco negro.

	Alb 30	DU 30	UPC 30	% D.O. PBPM 30	Hp 30
PAS 30			r 0,8571 p 0,0358		
A/G30	r 0,8810 p 0,0198				
PON-1 30	r 0,8144 p 0,0312	r 0,8313 p 0,0278			r 0,8024 p 0,0338
% D.O. PAPM 30				r -1 p 0,0000	

Tabla XV: Correlaciones encontradas en el Grupo G en la tercera visita (D90). Test de Spearman, significativo $p < 0,05$; correlaciones +: sombreado gris, correlaciones -: marco negro.

	Htc 90	Plaquetas 90	Cr 90	Pinorg 90	Alb 90	GlobT 90	A/G 90	PT 90	FS 90	% D.O. PAPM 90
PC 90						r 0,5925 p 0,0494				
Urea 90			r 0,8339 p 0,0057							
P inorg 90		r -0,8783 p 0,0084								
Alb 90	r 0,6246 p 0,0383									
GT 90	r -0,7846 p 0,0093				r -0,6270 p 0,0376					
A/G 90	r 0,7381 p 0,0144				r 0,8295 p 0,0059	r -0,9123 p 0,0025				
PT 90				r -0,6823 p 0,0236		r 0,6409 p 0,0335				
FS 90					r -0,9193 p 0,0023		r -0,6555 p 0,0297			
PON-1 90					r 0,7951 p 0,0084		r 0,6070 p 0,0441		r -0,8652 p 0,0041	
DU 90				r 0,7769 p 0,0100		r -0,6305 p 0,0365		r -0,7690 p 0,0108		
UPC 90						r 0,7671 p 0,0153				
% D.O. PBPM 90										r -1 p 0,0000

Tabla XVI: Correlaciones encontradas en el Grupo M en la tercera visita (D90). Test de Spearman, significativo $p < 0,05$; correlaciones +: sombreado gris, correlaciones -: marco negro.

	PC 90	TFG 90	Cr 90	Htc 90	Alb 90	GlobT 90	A/G 90	GB 90	CaT 90	Prot.CR 90	DU 90	FS 90	% D.O. PBPM 90
PC 90				r -0,8524 p 0,0241		r 0,7412 p 0,0499							
IFI 90				r -0,7864 p 0,0375		r 0,7610 p 0,0441						r 0,7483 p 0,0477	
Cr 90		r -0,8929 p 0,0287											
Plaquetas 90								r 0,9550 p 0,0193					
Alb 90									r 0,7619 p 0,0438				
GlobT 90				r -0,8333 p 0,0275									
A/G 90					r 0,8810 p 0,0198								
PT 90				r -0,8333 p 0,0275		r 0,8982 p 0,0175							
FS 90	r 0,8771 p 0,0203			r -0,9286 p 0,0140		r 0,8333 p 0,0275							
PON-1 90					r 0,8193 p 0,0302		r 0,8073 p 0,0327	r 0,7544 p 0,0486	p 0,9157 p 0,0154	r -0,7778 p 0,0396			
UPC 90											r -0,8571 p 0,0358		
% D.O. PAMP 90			r 0,8571 p 0,0358										r -1 p 0,0000
% D.O. PBPM 90			r -0,8571 p 0,0358										